

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DEN EINFLUSS VON CIAPILOM SOWIE
ALLOPURINOL AUF DIE SERUMHARNSÄURE
UND DIE AKTIVITÄTEN DER
OROTIDYLDECARBOXYLASE, HYPOXANTHIN-
GUANIN-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE
UND ADENIN-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE
AUS ERYTHROZYTEN UNTER
STANDARDISIERTEN ERNÄHRUNGSBEDINGUNGEN

GABRIEL WASMER

1982

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 2014774



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554013_0085

AUS DER MEDIZINISCHEN POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Professor Dr. N. Zöllner

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
CIAPILOM SOWIE ALLOPURINOL AUF DIE SERUMHARNSÄURE
UND DIE AKTIVITÄTEN DER OROTIDYLDECARBOXYLASE,
HYPOXANTHIN-GUANIN-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE UND
ADENIN-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AUS ERYTHROZYTEN
UNTER STANDARDISIERTEN ERNÄHRUNGSBEDINGUNGEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gabriel Wasmer
aus München

München 1982

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Gröbner
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. N. Zöllner
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	25. Februar 1982



Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

I. Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Synthese und Abbau der Purine	2
1.1.1. Synthese und Regulation	2
1.1.2. Abbau der Purine und Reutilisation	4
1.2. Synthese und Abbau der Pyrimidine	7
1.3. Interaktion zwischen Purin- und Pyrimidinstoffwechsel	10
2. Beeinflussung des Purin- und Pyrimidin- stoffwechsels durch Allopurinol	11
2.1. Resorption, Metabolismus und Aus- scheidung von Allopurinol	11
2.2. Einfluß auf den Purinstoffwechsel	11
2.2.1. Allopurinol als Hemmstoff der Xanthinoxidase	11
2.2.2. Allopurinol als Hemmstoff der Purin- biosynthese	13
2.2.2.1. Verminderung der intrazellulären PRPP-Konzentration	14
2.2.2.2. Hemmung des Enzyms PRPP-Amidotransferase	16
2.2.3. Verlust von Oxypurinen über den Darm bei oraler Purinzufuhr	17
2.3. Einfluß von Allopurinol auf den Pyrimidinstoffwechsel	18
3. Problemstellung	21
4. Methodik	23
4.1. Versuchspersonen	23
4.2. Versuchsablauf	23

	Seite
4.3. Formeldiät	26
4.4. Einnahme der RNS und der Medikamente	28
Ciapilom und Allopurinol	
4.5. Bestimmungsmethoden	29
4.5.1. Harnsäure im Serum	29
4.5.1.1. Reagentien	30
4.5.1.2. Durchführung der Bestimmungen der Serumharnsäure	30
4.5.1.3. Berechnung der Serumharnsäurekonzentration	31
4.5.1.4. Berechnung des Harnsäurepools	32
4.5.1.5. Berechnung des Harnsäureumsatzes und der Harnsäuresynthese	33
4.5.2. Messung der Aktivität der Orotidyl- decarboxylase	34
4.5.2.1. Reagentien	35
4.5.2.2. Durchführung	35
4.5.2.3. Berechnung	36
4.5.3. Messung der Aktivität der Hypoxanthin- Guanin-Phosphoribosyltransferase	37
4.5.3.1. Reagentien	37
4.5.3.2. Durchführung	38
4.5.3.3. Berechnung	40
4.5.4. Messung der Aktivität der Adenin- Phosphoribosyltransferase	40
4.5.5. Berechnung des Eiweißgehalts	41
4.5.5.1. Reagentien	42
4.5.5.2. Durchführung	43
4.5.5.3. Eichkurve	43

	Seite
5. Ergebnisse	46
5.1. Serumharnsäure	46
5.1.1. Versuchsperiode mit Allopurinol	46
5.1.2. Versuchsperiode mit Ciapilom	47
5.1.3. Berechnung des Harnsäure-Mindestpools	52
5.1.3.1. Harnsäurepool unter Allopurinol	52
5.1.3.2. Harnsäurepool unter Ciapilom	54
5.1.3.3. Ergebnisse der renalen Harnsäureausscheidung unter Allopurinol und Ciapilom	54
5.1.3.4. Harnsäureumsatz und Harnsäuresynthese	56
5.2. Aktivität der ODC	57
5.2.1. Versuchsperiode mit Allopurinol	57
5.2.2. Versuchsperiode mit Ciapilom	60
5.3. Aktivität der HGPRT	60
5.4. Aktivität der APRT	61
6. Diskussion	66
6.1. Diskussion der Methoden	66
6.1.1. Harnsäurebestimmung im Serum	66
6.1.2. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz	67
6.1.3. Orotidyldecarboxylase	69
6.1.4. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	70
6.1.5. Adenin-Phosphoribosyltransferase	70
6.1.6. Bestimmung der Eiweißkonzentration	71
6.2. Diskussion der Ergebnisse	73
6.2.1. Vergleiche mit anderen Autoren	73
6.2.1.1. Serumharnsäure	73
6.2.1.2. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz	76
6.2.1.3. Orotidyldecarboxylase	79
6.2.1.4. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase	79
6.2.1.5. Adenin-Phosphoribosyltransferase	81

	Seite
6.2.2. Vergleich der Ergebnisse unter Ciapilom mit denen unter Allopurinol	82
6.2.2.1. Vergleich der Wirkung auf Serumharnsäure, Harnsäurepool und Harnsäureumsatz	82
6.2.2.2. Vergleich der Wirkung auf die Aktivitäten der ODC, HGPRT und APRT	83
6.2.2.3. Ergebnisvergleich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte	84
6.3. Überlegungen zur Wirkungsweisen von Ciapilom	85
7. Zusammenfassung	88
8. Anhang	90
9. Literaturverzeichnis	92

II. Verzeichnis der Abbildungen

	Seite
Abb. 1: Ciapilom	2
Abb. 2: Purinsynthese	3
Abb. 3: Purinzyklus	5
Abb. 4: Biosynthese der Pyrimidinnukleotide	8
Abb. 5: Umwandlung von Pyrimidinnukleotiden und Pyrimidinreutilisation	9
Abb. 6: Reaktionen der Xanthinoxydase	12
Abb. 7: Schematische Darstellung des Purin- defizits unter Allopurinoltherapie	17
Abb. 8: Umwandlung von Allopurinol und Oxypurinol in Ribonukleotide	19
Abb. 9: Versuchsverlauf	24
Abb. 10: Abspaltung von $^{14}\text{CO}_2$ bei der ODC-Reaktion	34
Abb. 11: Eichkurve zur Eiweißbestimmung	45
Abb. 12: Serumharnsäure unter Allopurinol	49
Abb. 13: Serumharnsäure unter Ciapilom	51
Abb. 14: Harnsäurepool unter Allopurinol	53
Abb. 15: Harnsäurepool unter Ciapilom	55
Abb. 16: Aktivitäten der ODC unter Allopurinol	59
Abb. 17: Aktivitäten der ODC unter Ciapilom	59
Abb. 18: Aktivitäten der HGPRT unter Allopurinol	63
Abb. 19: Aktivitäten der HGPRT unter Ciapilom	63
Abb. 20: Aktivitäten der APRT unter Allopurinol	65
Abb. 21: Aktivitäten der APRT unter Ciapilom	65
Abb. 22: Mögliche Reaktionen der Xanthinoxydase mit Allopurinol und Ciapilom	86

III. Verzeichnis der Tabellen

	Seite
Tab. 1: PRPP-abhängige Reaktionen	14
Tab. 2: Daten der Versuchspersonen	25
Tab. 3: Einzelwerte der Extinktionen der Eichkurve zur Eiweißbestimmung	44
Tab. 4: Serumharnsäure unter Allopurinol. Einzelwerte, Mittelwerte, steady state	48
Tab. 5: Serumharnsäure unter Ciapilom. Einzelwerte, Mittelwerte, steady state	50
Tab. 6: Harnsäurepool unter Allopurinol. Einzelwerte, Mittelwerte, steady state	53
Tab. 7: Harnsäurepool unter Ciapilom. Einzelwerte, Mittelwerte, steady state	55
Tab. 8: Steady states des Harnsäurepools und der Harnsäureausscheidung vor und nach Allopurinol bzw. Ciapilom	56
Tab. 9: Harnsäurepool und Harnsäureumsatz, steady states, Umsatzrate k	56
Tab. 10: Aktivitäten der ODC unter Allopurinol	58
Tab. 11: Aktivitäten der ODC unter Ciapilom	58
Tab. 12: Aktivitäten der HGPRT unter Allopurinol	62
Tab. 13: Aktivitäten der HGPRT unter Ciapilom	62
Tab. 14: Aktivitäten der APRT unter Allopurinol	64
Tab. 15: Aktivitäten der APRT unter Ciapilom	64
Tab. 16: Serumharnsäurewerte: Vergleich mit anderen Autoren	75
Tab. 17: Harnsäurepool und Harnsäureumsatz: Vergleich mit anderen Autoren	78

	Seite
Tab. 18: Aktivität der ODC: Vergleich mit anderen Autoren	80
Tab. 19: Aktivität der HGPRT: Vergleich mit anderen Autoren	80
Tab. 20: Aktivität der APRT: Vergleich mit anderen Autoren	81
Tab. 21 Vergleich der steady states von Serumharnsäure, Harnsäurepool und Harnsäureumsatz unter Allopurinol und Ciapilom	82

IV. Verzeichnis der Abkürzungen

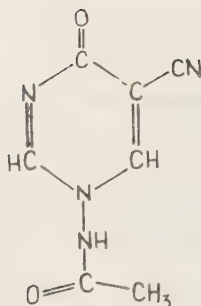
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
AP	Allopurinol
APRT	Adenin-Phosphoribosyltransferase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Bovin-Serum-Albumin
CIA	Ciapilom
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
GMP	Guanosin-5'-monophosphat
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HS	Harnsäure
IMP	Inosin-5'-monophosphat
KG	Körpergewicht
MMSP	Magermilchsprühpulver
ODC	Orotidyldecarboxylase
OPRT	Orotat-Phosphoribosyltransferase
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat
RNS	Ribonukleinsäure
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UMP	Uridin-5'-monophosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat
VP	Versuchspersonen
XMP	Xanthin-5'-monophosphat
XO	Xanthinoxidase

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN EINFLUSS VON
CIAPILOM SOWIE ALLOPURINOL AUF DIE SERUMHARNSÄURE
UND DIE AKTIVITÄTEN DER OROTIDYLDECARBOXYLASE,
HYPOXANTHIN-GUANIN-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE UND
ADENIN-PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE AUS ERYTHROZYTEN
UNTER STANDARDISIERTEN ERNÄHRUNGSBEDINGUNGEN

1. Einleitung

In der Behandlung der Hyperurikämie und Gicht werden zwei Wege der medikamentösen Behandlung beschritten. In beiden Fällen sollen die erhöhten Harnsäurespiegel im Plasma und im Interstitium in den Normalbereich gesenkt werden. Dazu verwendet man zum einen urikosurisch wirkende Substanzen, welche allerdings mit dem Mangel der Erhöhung der Harnsäurekonzentration im Harn und den bekannten Folgen (Gefahr der Nierensteinbildung, insbesondere bei Einleitung der Therapie oder bei unregelmäßiger Tabletteneinnahme) behaftet sind. Zum andern werden Mittel eingesetzt, die die Harnsäurebildung hemmen. Dabei hat sich Allopurinol, ein Hemmstoff des Enzyms Xanthinoxidase, bewährt.

In der vorliegenden Arbeit sollten Wirkung und Wirkungsmechanismus von Allopurinol und Ciapilom, einem zur Behandlung der Hyperurikämie und Gicht neu entwickelten Präparat, in vergleichenden Untersuchungen unter den Bedingungen einer standardisierten Formel-diät an sieben gesunden Versuchspersonen geprüft werden.



Ciapilom:

Molekulargewicht: 178,15

Summenformel: $C_7H_6N_4O_2$

Chemische Bezeichnung:

5'-cyan-1'-acetylamino-

4 (1H)-pyrimidinon

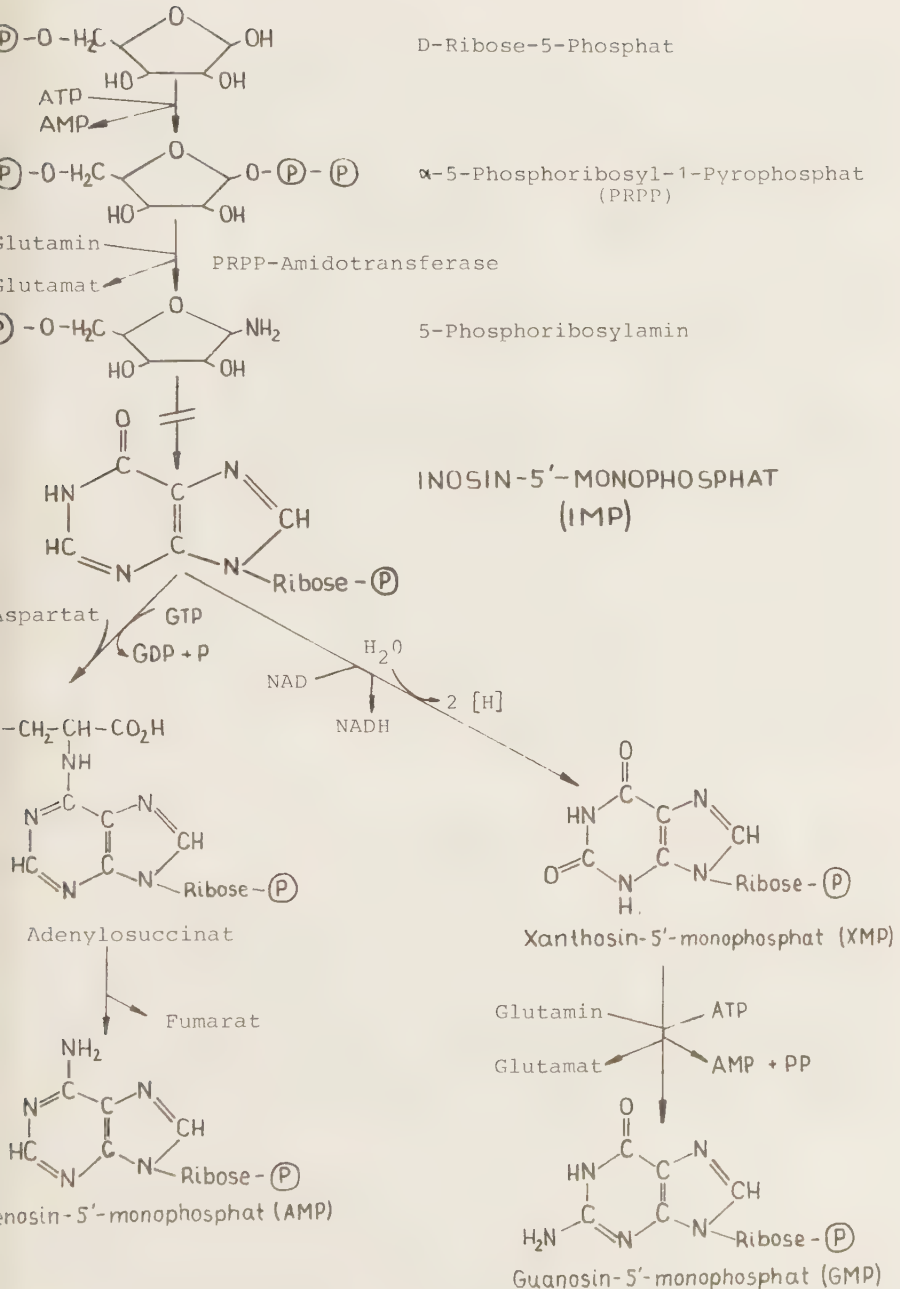
Abbildung 1: Ciapilom

1.1. Synthese und Abbau der Purine

1.1.1. Synthese und Regulation

Die Biosynthese der Purine beginnt mit der Pyrophosphorylierung von D-Ribose-5-Phosphat. Das entstehende α -5-Phosphoribosyl-1-Pyrophosphat (PRPP) ist Ausgangssubstanz für die weitere Nukleotidbiosynthese (Zusammenfassung bei Wyngaarden, 1978 (55) und bei Zöllner, 1960 (58)) und Substrat für das Enzym 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat-Amidotransferase (PRPP-Amidotransferase), welches die Amidierung von PRPP zu 5-Phosphoribosylamin katalysiert.

Aus diesem entsteht als wichtigstes Endprodukt nach einer Reihe von Zwischenschritten Inosin-5'-monophosphat (IMP). IMP ist Ausgangspunkt für die Synthese der anderen Purinnukleotide Adenosin-5'-monophosphat (AMP) und Guanosin-5'-monophosphat (GMP), welche durch Aminierung und Oxydation aus IMP entstehen (Zusammenfassung bei Zöllner, 1960 (58)).



Bildung 2: Purinsynthese
 (modifiziert nach Zöllner, 1960 (58))

AMP und GMP werden im Körper zur Synthese von Nukleinsäuren und purinhaltigen Coenzymen verwendet (z.B. ATP, ADP, GTP, FAD, CoA). Die Überführung von AMP und GMP in die entsprechenden Di- und Triphosphate ist mittels transphosphorylierender Reaktionen möglich.

Die Regulation der Purinbiosynthese erfolgt über mehrere Mechanismen. Das geschwindigkeitsbestimmende Enzym stellt die PRPP-Amidotransferase dar (Kelley et al., 1978 (34)). Es wird durch die Mononukleotide IMP, AMP und GMP im Sinne einer Rückkopplungshemmung (feed-back-inhibition) beeinflusst (Caskey et al., 1964 (6)). Eine Einschränkung der Purinsynthese kann außerdem durch die Verminderung des Vorrats an PRPP erfolgen, dem Substrat der PRPP-Amidotransferase. Ein weiterer Kontrollmechanismus besteht in der gegenseitigen Regulation der Bildung von AMP bzw. GMP aus IMP, da zur Umwandlung von IMP in Adenylosuccinat GTP notwendig ist und die Bildung von GMP aus Xanthosin-5'-monophosphat (XMP) ATP-abhängig ist. (Siehe Abbildung 2)

1.1.2. Abbau der Purine und Reutilisation

Alle Nukleotide können vom menschlichen Körper zu den entsprechenden Nukleosiden und Purinen abgebaut werden. Umgekehrt werden auch freie Purine und Nukleoside zur Nukleotidsynthese verwendet, die Purine können also vollständig ineinander umgewandelt werden. Die Summe dieser Reaktionen wurde von einigen Autoren Purinzyklus (Zöllner, 1960 (58)) genannt. (Siehe Abbildung 3)

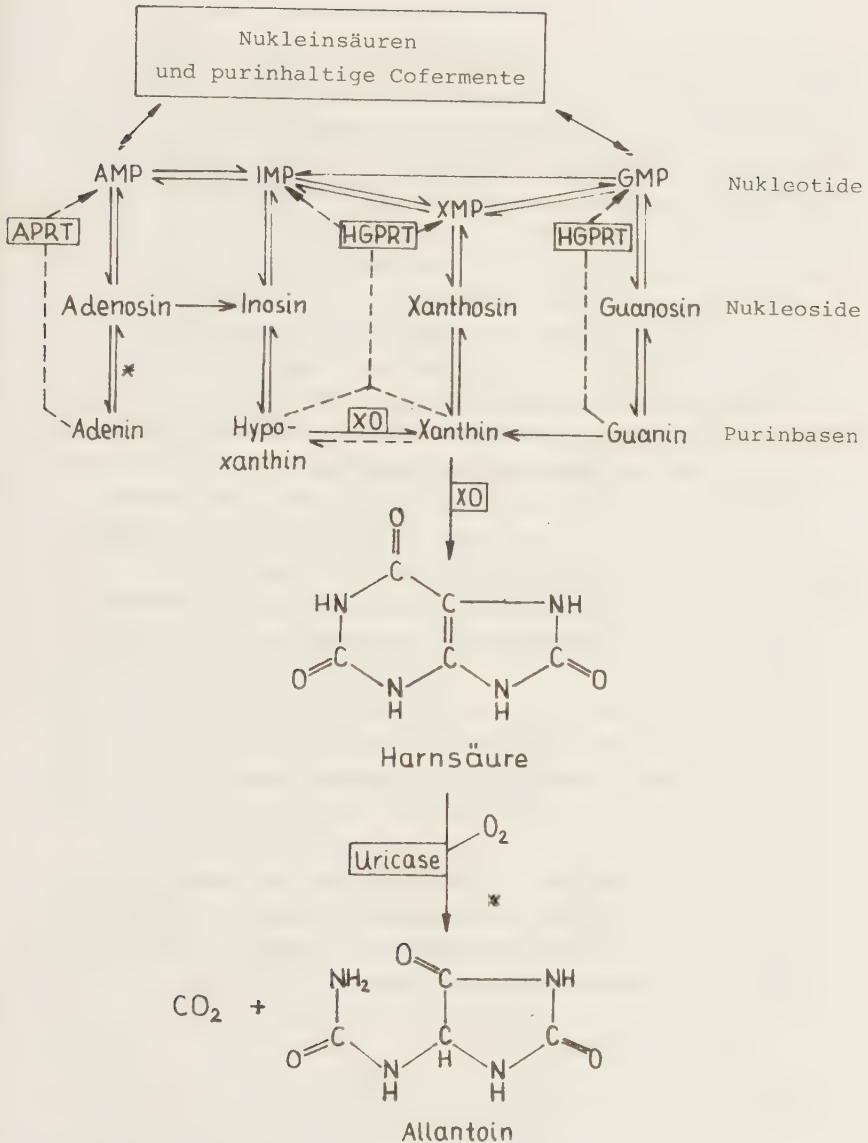


Abbildung 3: Purinzyklus

(modifiziert nach Zöllner, 1960 (58))

* nicht beim Menschen

XO = Xanthinoxidase, XMP = Xanthin-5'-monophosphat

Zum Teil werden die Purinbasen, die durch Hydrolyse der Nukleoside freigesetzt werden, im Stoffwechsel reutilisiert. Durch Reaktion mit 5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) wird aus Adenin mit Hilfe des Enzyms Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) das Mononukleotid AMP in einer irreversiblen Reaktion resynthetisiert. Eine Regulation des Enzyms ist möglich durch die Konzentration von PRPP und, im Sinne einer Produkthemmung, von AMP. Aus Xanthin, Hypoxanthin und Guanin werden mit PRPP durch das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) die Mononukleotide XMP, IMP und GMP resynthetisiert. Die Geschwindigkeit der Reaktion von HGPRT mit Xanthin beträgt nur 0,3 % von derjenigen mit Hypoxanthin oder Guanin. Verschiedene Purinanaloga (z.B. Allopurinol u.a.) sind ebenfalls Substrat der HGPRT. Das Enzym ist von der PRPP-Konzentration abhängig und wird von den Reaktionsprodukten IMP und GMP gehemmt (Wyngaarden et al., 1978 (55)).

Überschüssige Purinbasen werden über die Zwischenprodukte Hypoxanthin bzw. Xanthin (Adenosin über Inosin zu Hypoxanthin, Guanosin über Guanin zu Xanthin) durch das Enzym Xanthinoxidase (XO), ein Flavoproteid von geringer Substratspezifität, irreversibel zu Harnsäure oxidiert. Diese wird beim Menschen unverändert ausgeschieden, bei einigen Species und in vitro kann sie durch Uricase zu Allantoin abgebaut werden.

1.2. Synthese und Abbau der Pyrimidine

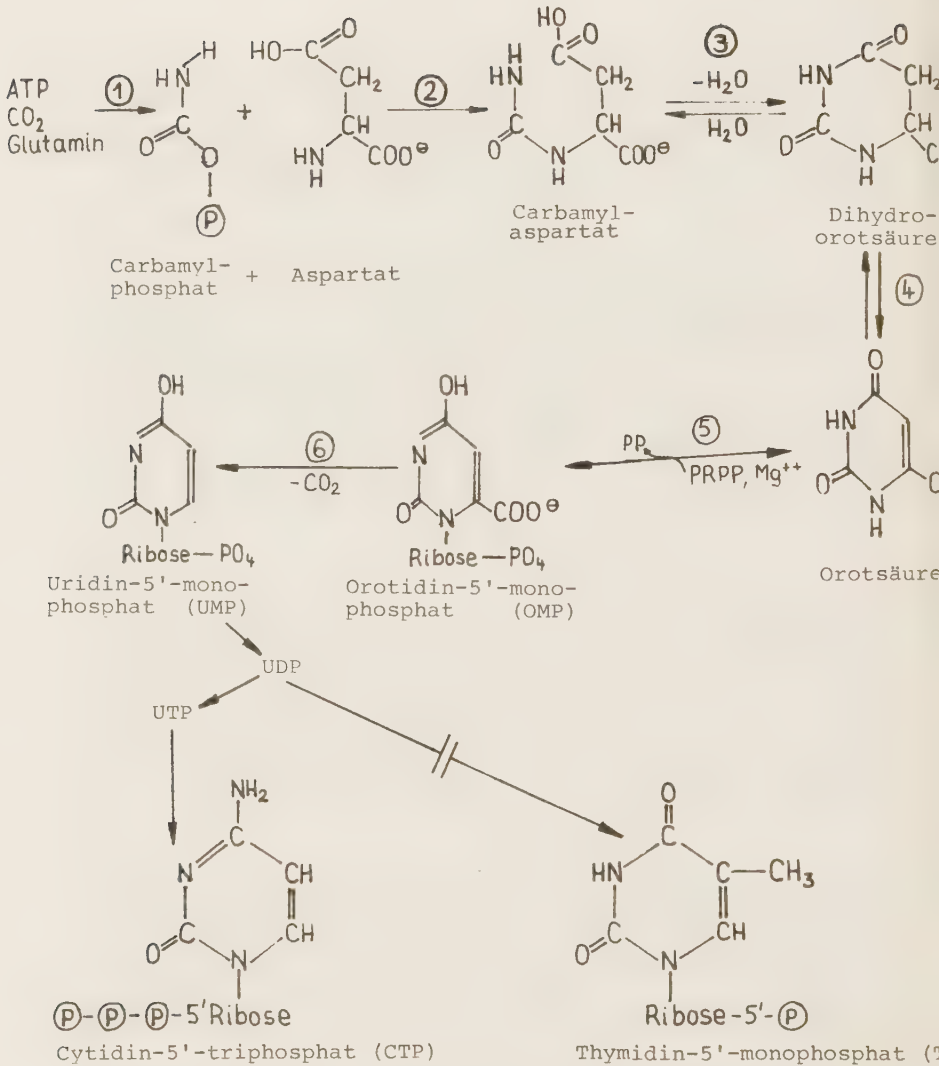
Die Pyrimidinnukleotide können entweder de novo synthetisiert werden oder aus Basen bzw. Ribonukleosiden aufgebaut werden.

Die Pyrimidinsynthese de novo führt beim Menschen, ausgehend von Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Kohlendioxid sowie Ammonium oder Glutamin, über eine Reihe von Zwischenschritten (siehe Abbildung 4) zur Orotsäure, dem eigentlichen Endprodukt der Pyrimidinbiosynthese (Zusammenfassung bei Gröbner und Zöllner, 1975 (22)). Aus Orotat entsteht, katalysiert durch Orotat-Phosphoribosyltransferase (OPRT), das erste Pyrimidinnukleotid, Orotidin-5'-monophosphat (OMP).

Durch Orotidyldecarboxylase (ODC) entsteht Uridin-5'-monophosphat (UMP), welches zu Uridin-5'-diphosphat und weiter zu Uridin-5'-triphosphat (UDP und UTP) phosphoryliert werden kann. Aus UTP bzw. UDP gehen durch Aminierung bzw. Methylierung die anderen Pyrimidinnukleotide Cytidinphosphat und Thymidinphosphat hervor. (Siehe Abbildung 4)

Uridin-5'-monophosphat und Cytidin-5'-monophosphat (CMP) können auch direkt aus den Pyrimidinbasen oder ihren Nukleosiden entstehen. Eine Übersicht über die möglichen Umwandlungen der Pyrimidinnukleotide und die Pyrimidinreutilisation gibt Abbildung 5, Seite 9.

Eine Regulation der Pyrimidinsynthese findet sich wahrscheinlich auf der ersten Stufe der de-novo-Synthese: Gröbner und Zöllner (1977 (23)) berichteten, daß in vivo die durch Allopurinol induzierte Orotazidurie durch Ribonukleinsäure (RNS), sein Hydrolysat sowie die in RNS



- (1) Carbamylphosphatsynthetase II (4) Dihydroorotsäure-Dehydrogenase
 (2) Aspartat-Transcarbamylase (5) Orotat-Phosphoribosyltransferase
 (3) Dihydroorotase (6) Orotidyldecarboxylase

Abbildung 4: Biosynthese der Pyrimidinnukleotide
 (nach Kelley und Smith, 1978 (34))

werden, weiter zu den Basen Uracil und Thymin (Kelley et al., 1978 (34); Smith, 1973 (50)). Anders als beim Abbau der Purine findet sich hier kein Endprodukt in größeren Mengen im Urin. Die Pyrimidinbasen werden enzymatisch gespalten und zum größten Teil in Form von NH_2 und CO_2 ausgeschieden.

1.3. Interaktionen zwischen Purin- und Pyrimidin-stoffwechsel

Zwischen der Bildung von Purin- und Pyrimidinnukleotiden müssen enge Beziehungen bestehen, da beide zum größten Teil in annähernd äquimolaren Mengen in die Synthese der Nukleinsäuren eingehen. Dabei spielt möglicherweise Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) eine wichtige Rolle (Zusammenfassung bei Gröbner u. Zöllner, 1975 (22)).

PRPP ist der Aktivator der Enzyme Carbamylphosphatsynthetase II und Aspartattranscarbamylase, die die ersten Schritte in der Biosynthese der Pyrimidine katalysieren. Ferner ist es essentielles und geschwindigkeitslimitierendes Substrat der Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT), welche die Umwandlung von Orotsäure in OMP katalysiert. Ebenso ist PRPP ein essentielles und geschwindigkeitslimitierendes Substrat bei der Synthese der Purinnukleotide, also der Enzyme PRPP-Amidotransferase, Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT). So hat ein Ansteigen der intrazellulären PRPP-Konzentration auch ein Ansteigen der Pyrimidin- und Purinsynthese zur Folge (und damit auch eine gesteigerte Harnsäurebildung), ein Absinken der PRPP-Konzentration gegenteiligen Effekt. Hierin könnte ein Mechanismus zur Regulation der Purin- und Pyrimidinsynthese liegen (Kelley und Smith, 1978 (34)).

2. Beeinflussung des Purin- und Pyrimidinstoffwechsels durch Allopurinol

2.1. Resorption, Metabolismus und Ausscheidung von Allopurinol

Allopurinol (4-Hydroxypyrazolo-(3,4-d)-pyrimidin) wird rasch aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und mit einer biologischen Halbwertszeit von nur 2 bis 3 Stunden metabolisiert. Nur etwa 3 bis 10 % der verabreichten Dosis erscheinen unverändert im Urin (Elion et al., 1966 (11)). Etwa 20 % werden in den Faeces gefunden (Goodman u. Gilman, 1980 (16)). Der größte Anteil wird in vivo durch Xanthinoxydase zu Oxypurinol oxydiert. Ein kleiner Anteil des Allopurinol wird zu Allopurinol-ribonukleosid (Krenitsky et al., 1967 (37)) und zu Allopurinolribonukleotid (Fox et al., 1970 (12)) umgewandelt. Oxypurinol wird größtenteils unverändert im Urin ausgeschieden, ein kleiner Teil wird zu Oxypurinolribonukleosid und -ribonukleotid umgewandelt (Zusammenfassung bei Gröbner u. Zöllner, 1975 (21)). (Siehe Abbildung 6)

2.2. Einfluß auf den Purinstoffwechsel

2.2.1. Allopurinol als Hemmstoff der Xanthinoxydase

Allopurinol wurde erstmals bei der Behandlung leukämischer Patienten mit dem Antimetaboliten 6-Mercaptopurin zusammen eingesetzt, um die durch Xanthinoxydase (XO) katalysierte Oxydation zu 6-Mercaptotarnsäure zu verhindern. Unter der Behandlung kam es zu einem ausgeprägten Abfall der Serumharnsäure und der Harnsäure-

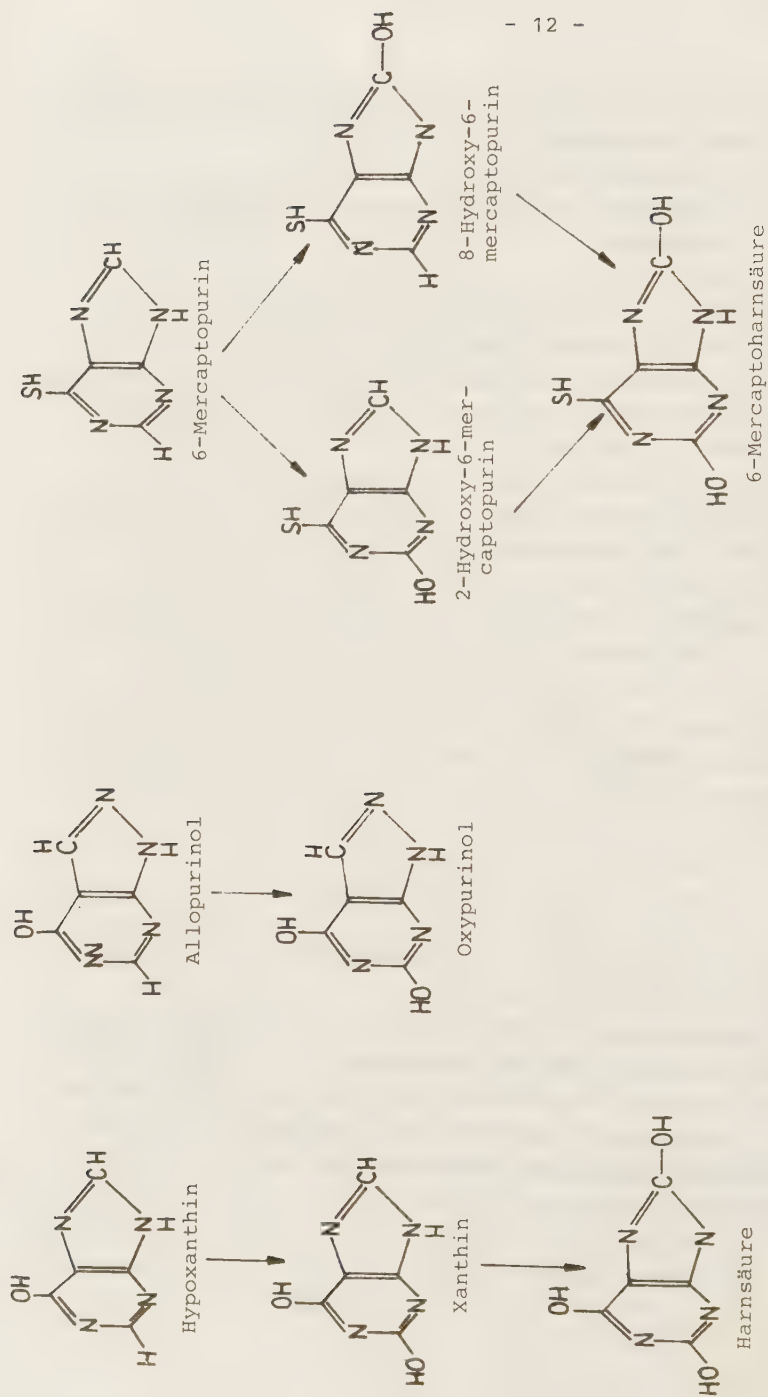


Abbildung 6: Reaktionen der Xanthinoxidase (nach Gröbner u. Zöllner, 1975 (21))

ausscheidung im Urin (Elion et al., 1962 (10); Rundles et al., 1963 (48)). Die Ursache ist in einer kompetitiven Hemmung der Xanthinoxydase durch Allopurinol zu sehen (Gamp et al., 1966 (15); Watts et al., 1965 (54); Wyngaarden et al., 1965 (56); Zöllner, 1967 (60); Zöllner et al., 1976 (67)). Allopurinol ist nicht nur kompetitiver Hemmer, sondern auch selbst Substrat der Xanthinoxydase. Ebenso hemmt sein Oxydationsprodukt Oxypurinol (Alloxanthin) die Xanthinoxydase und zwar ebenso stark wie Allopurinol (Spector et al., 1970 (51)). Die durch Xanthinoxydase katalysierten Oxydationen von Purinen sind in Abbildung 6 zusammengestellt.

Infolge der Hemmung der Xanthinoxydase kommt es unter Allopurinol zu einem Anstieg der Ausscheidung von Hypoxanthin und Xanthin im Urin (Chalmers et al., 1968 (7); Rundles, 1966 (46); Zöllner et al., 1972 (63). Die Verringerung der Harnsäureausscheidung im Urin wird jedoch nicht vollständig durch die vermehrte Oxypurinelimination ausgeglichen (Rundles et al., 1966 (47); Zöllner u. Gröbner, 1970 (64)), sodaß die Vermutung nahe liegt, daß Allopurinol auch zu einer Beeinflussung der Purinbiosynthese führt (Fox et al., 1970 (13); Gröbner und Zöllner, 1975 (21); Holmes et al., 1973 (27); Kelley et al., 1973 (30); McCollister et al., 1964 (42)).

2.2.2. Allopurinol als Hemmstoff der Purinbiosynthese

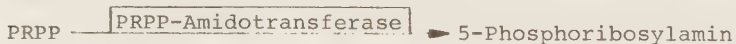
Die Hemmung der Purinbiosynthese unter der Behandlung mit Allopurinol ist letztlich nicht vollständig geklärt. Verschiedene Autoren zeigen für diese Hemmung mehrere mögliche Mechanismen auf, deren quantitative Wertigkeit noch nicht eindeutig gesichert ist (Zusammenfassung bei Gröbner u. Zöllner, 1975 (21); Kelley et al., 1970 (35)).

2.2.2.1. Verminderung der intrazellulären PRPP-Konzentration

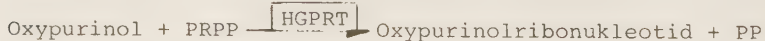
5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) ist in der Purinsynthese Substrat der Glutamin-PRPP-Amidotransferase, die die Bildung von 5-Phosphoribosylamin katalysiert (geschwindigkeitslimitierende Reaktion der Purinsynthese) (Kelley et al., 1968 (32)). Die Hemmung der Neusynthese von Purinen kann durch vermehrten Verbrauch von PRPP in Phosphoribosyltransferase-Reaktionen erklärt werden (Wyngaarden u. Kelley, 1978 (55)).

Tabelle 1: PRPP-abhängige Reaktionen

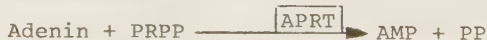
1.) Reaktion der PRPP-Amidotransferase



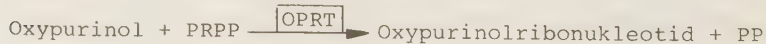
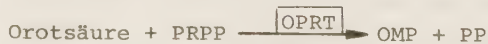
2.) Reaktionen der HGPRT



3.) Reaktion der APRT



4.) Reaktionen der OPRT



Fox et al. (1970 (12)) zeigten, daß nach der Gabe von Allopurinol eine signifikante Abnahme der PRPP-Konzentration in den Erythrozyten gemessen werden kann. Die Autoren führten diese Abnahme auf die Bildung von Allopurinolribonukleotid zurück. Mit der Umwandlung von Allopurinol oder Oxypurinol zu den entsprechenden Ribonukleotiden wird PRPP verbraucht, das nicht mehr als Substrat für die PRPP-Amidotransferase zur Verfügung steht und zu einer verminderten Purinsynthese de novo führt.

Inwieweit auch die durch APRT, HGPRT und OPRT katalysierten Reaktionen (siehe Tabelle 1), die ebenfalls PRPP verbrauchen und von der PRPP-Konzentration abhängig sind, den PRPP-Vorrat in diesem Sinne mindern, ist nicht geklärt. Doch scheint dies möglich, da bei verminderter oder nahezu fehlender Aktivität der HGPRT, wahrscheinlich infolge geringerer Bildung von IMP und GMP sowie einer erhöhten intrazellulären PRPP-Konzentration (durch herabgesetzten Verbrauch), es zu einer vermehrten Purinbiosynthese kommt (Zusammenfassung bei Wyngaarden und Kelley, 1978 (55)).

Das Enzym HGPRT spielt eine entscheidende Rolle. Kelley et al. (1968 (32)) konnten zeigen, daß bei Patienten mit verminderter Aktivität dieses Enzyms Allopurinol zu keiner Beeinflussung der erhöhten Purinbiosynthese führt. Auch steht damit die Beobachtung von Beardmore et al. (1970 (3)) in Einklang, daß es bei zwei Patienten mit Lesch-Nyhan-Syndrom (HGPRT-Mangel) unter Allopurinol zu einem Absinken des Serumharnsäurespiegels bei einem Anstieg der renalen Hypoxanthin- und Xanthinausscheidung in äquimolarer Menge kam.

Wie unter 1.2. gezeigt, wird auch bei Reaktionen der Pyrimidinsynthese PRPP verbraucht. Unter Allopurinol kommt es durch Hemmung der Orotidyldecarboxylase (ODC) zu einem Anstieg der Orotsäure und des Orotidin-5'-monophosphats (OMP) (Fox et al., 1970 (13); Kelley et al., 1970 (28)). Die vermehrt anfallende Orotsäure wird unter PRPP-Verbrauch größtenteils durch OPRT in OMP umgewandelt (siehe auch 2.3.). Tatsächlich konnten Delbarre und Auscher (1963 (8)) zeigen, daß es unter Gabe von Orotsäure in vivo zu einer starken Verringerung der Urikämie kam. Rajalakshmi u. Handschumacher (1968 (45)) und Kelley et al. (1970 (29)) konnten die mit einer Abnahme der PRPP-Konzentration einhergehende Hemmung der Purinbiosynthese in vitro nachweisen.

2.2.2.2. Hemmung des Enzyms Glutamin-5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat-Amidotransferase (PRPP-Amidotransferase)

Allopurinol führt durch Hemmung der Xanthinoxidase zu einer vermehrten Bildung von Inosin-5'-monophosphat (IMP) aus Hypoxanthin, in geringem Ausmaß auch aus Xanthin (Wyngaarden et al., 1978 (55)). IMP sowie die daraus entstehenden Adenin- und Guaninnukleotide sind allosterische Inhibitoren der PRPP-Amidotransferase (Caskey et al., 1964 (6); Holmes et al., 1973 (27); Kelley et al., 1973 (30)). Wie erwähnt ist dieses Enzym geschwindigkeitsbestimmend für die Purinbiosynthese (Kelley et al., 1968 (32)). Auch das Ribonukleotid des Allopurinol hemmt in vitro die PRPP-Amidotransferase des Menschen (McCollister et al., 1964 (42); Holmes et al., 1973 (27)).

2.2.3. Verlust von Oxypurinen über den Darm bei oraler Purinzufuhr

Allopurinol beeinflusst die endogene und exogene Uratquote unterschiedlich. Während bei einer Dosis von 400 mg/die die Hemmung der endogenen Harnsäuresynthese nur etwa 50 % beträgt, wird die Harnsäureproduktion aus exogenen Purinen fast vollständig unterdrückt (Zöllner und Gröbner, 1970 (64)); Zöllner et al., 1973 (62)). Als mögliche Erklärung wird angenommen, daß sich das im Dünndarm resorbierte Allopurinol im Dünndarmepithel anreichert und die dort reichlich vorhandene Xanthinoxidase (Watts et al., 1965 (54)) hemmt. Es ist denkbar, daß die dabei vermehrt entstehenden Oxypurine nicht ins Interstitium oder Plasma, sondern in das Darmlumen diffundieren und dem Körper somit über den Darm verloren gehen (Zöllner u. Gröbner, 1970 (64)).

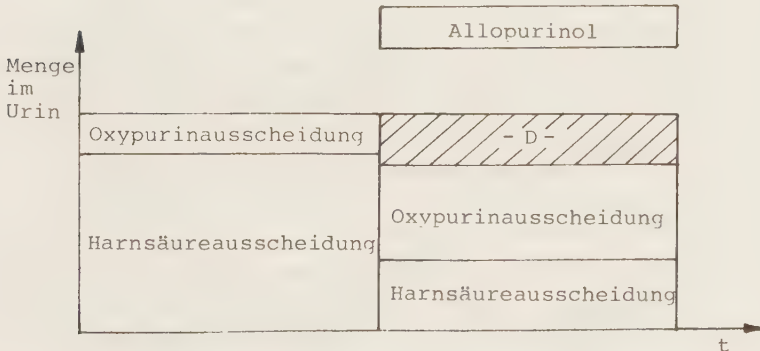


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Purindefizits unter Allopurinoltherapie

Die Differenz - D - zwischen den Abbauprodukten der Purine vor und unter Allopurinolbehandlung (siehe Abbildung 7) kann unter purinfreier Diät durch eine

Hemmung der de-novo-Synthese von Purinen durch Allopurinol bei gleichzeitiger oraler Purinzufuhr und durch einen Verlust von Oxypurinen über den Darm erklärt werden (Gröbner u. Zöllner, 1975 (21)).

2.3. Einfluß von Allopurinol auf den Pyrimidin-stoffwechsel

Mehrere Autoren beobachteten unter der Behandlung mit Allopurinol einen Anstieg der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin (Fox et al., 1970 (13); Kelley et al., 1970 (28); Kelley et al., 1970 (36)). Dieser Anstieg ist auf eine Hemmung des Enzyms Orotidyldecarboxylase (ODC) zurückzuführen, das für die Umwandlung von Orotidin-5'-monophosphat (OMP) in Uridin-5'-monophosphat verantwortlich ist (siehe Abbildung 4). Invitro-Untersuchungen ergaben, daß Xanthin- und Allopurinolribonukleotid ausgeprägte Inhibitoren der ODC sind (Kelley et al., 1970 (28)), aber auch 1- und 7-Oxypurinolribonukleotid hemmen die ODC (Kelley u. Smith, 1978 (34)). Xanthin-, Allopurinol- und 1-Oxypurinolribonukleotid werden in Gegenwart von PRPP durch HGPRT synthetisiert. Der Anstieg der Orotidin- und Orotsäureausscheidung bei Patienten ohne HGPRT-Aktivität (Lesch-Nyhan-Syndrom) unter Gabe von Allopurinol (Beardmore et al., 1970 (3); Fox et al., 1971 (14)) wird durch 7-Oxypurinolribonukleotid verursacht. Dieses wird durch das Enzym Orotatphosphoribosyltransferase (OPRT) aus Oxypurinol gebildet (Beardmore et al., 1971 (4)) (siehe Abbildung 8) und ist für die Hemmung der ODC bei Lesch-Nyhan-Patienten verantwortlich (Zusammenfassung bei Wyngaarden u. Kelley, 1978 (55)).

Der Hemmung der Orotidyldecarboxylase folgt unter kontinuierlicher Verabreichung von Allopurinol innerhalb

von ein bis zwei Wochen ein Anstieg der Aktivität der OPRT und ODC (Beardmore et al., 1972 (2); Fox et al., 1971 (14)). Dieser Aktivitätsanstieg der ODC unter Allopurinolbehandlung ist auf eine Stabilisierung des En-

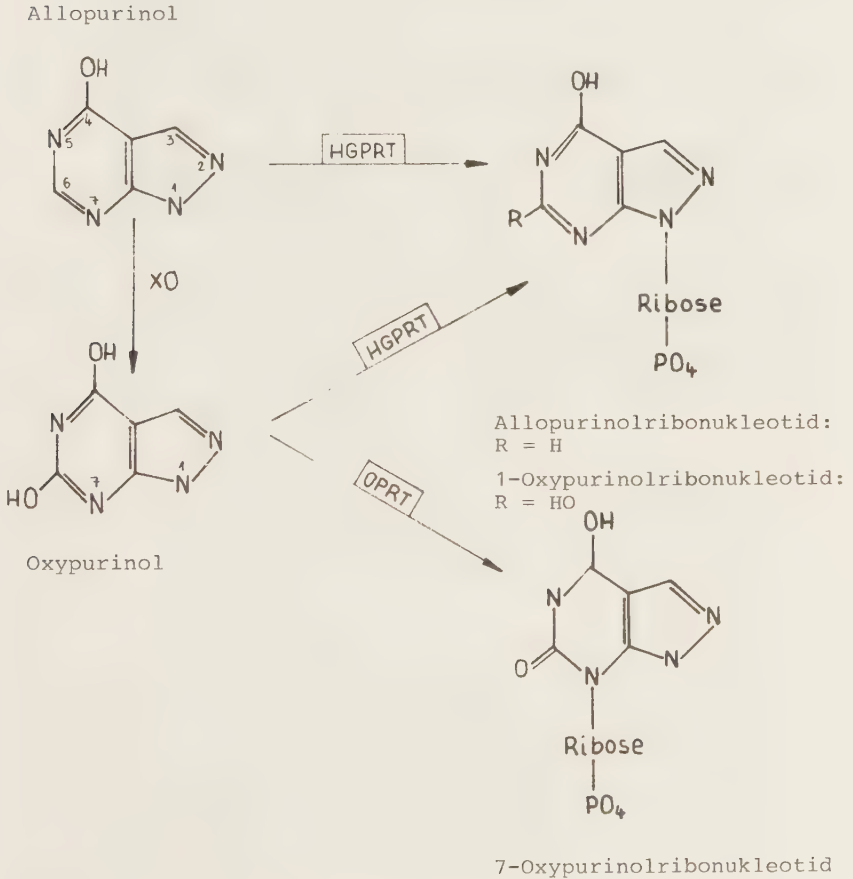


Abbildung 8: Umwandlung von Allopurinol und seines Oxydationsprodukts Oxypurinol in Ribonukleotide (nach Wyngaarden u. Kelley, 1978 (55))

zyms, wahrscheinlich auf der Basis einer Änderung der Molekülgröße, zurückzuführen (Fox et al., 1971 (14); Gröbner et al., 1975 (19)).

Zöllner und Gröbner (1971 (65)) berichteten als erste über eine Beeinflussung der Allopurinol-induzierten Orotazidurie durch Ribonukleinsäure (RNS). Die zusätzliche Verabreichung von RNS bewirkte bei Personen, die Allopurinol einnahmen, innerhalb weniger Tage eine deutliche Verminderung der renalen Ausscheidung von Orotidin und Orotsäure. Entsprechend führte die Zulage von Allopurinol bei Personen, die RNS einnahmen, zu keinem ausgeprägten Anstieg der Orotsäureausscheidung. Auch RNS-Hydrolysat und die Nukleotide Uridin-, Cytosin- und Guanosin-5'-monophosphat zeigten diesen Effekt (Zöllner et al., 1975 (66)). Diese Befunde sind mit einer Hemmung der Pyrimidinsynthese durch exogene Pyrimidinderivate vereinbar (Gröbner u. Zöllner, 1977 (23)).

3. Problemstellung

Die Dauertherapie der Hyperurikämie und Gicht beruht auf der Beeinflussung der Serumharnsäurekonzentration auf zwei Wegen:

1. Diätetische Maßnahmen (Einschränkung der Purinzufuhr mit der Nahrung und der Alkoholzufuhr)
2. Vermehrung der renalen Harnsäureausscheidung durch Einschränkung der tubulären Rückresorption mit Hilfe von Urikosurika (= urikosurische Therapie) oder Verminderung der Harnsäurebildung durch Hemmung der Xanthinoxydase (= urikostatische Therapie)

Wegen der Gefahr von Nierensteinen sollte auch bei asymptomatischer Hyperurikämie und Gicht ohne Zeichen einer Nierenbeteiligung ein Xanthinoxydasehemmer gegeben werden. Allopurinol ist der einzige Xanthinoxydasehemmer, der zur Senkung der Serumharnsäure eingesetzt werden kann. Es ist deshalb erforderlich, noch weitere Substanzen mit dieser Wirkung zu suchen, da Nebenwirkungen unter Allopurinol zwar selten sind, das Mittel jedoch hin und wieder wegen allergischer Reaktionen abgesetzt werden muß.

Ein Unternehmen der pharmazeutischen Industrie konnte uns 1977 ein neues Präparat (Ciapilom) vorstellen, welches sich in zahlreichen betriebsinternen Vorversuchen an Versuchstieren und gesunden Probanden unter Normal-kost als harnsäuresenkend erwiesen hatte und eine geringere Toxizität als Allopurinol zeigte (Information der Herstellerfirma).

Mit dieser Arbeit sollte die Wirkung und Wirkungsweise von Ciapilom mit der von Allopurinol unter einer purinfreien standardisierten Formeldiät und einer durch kontinuierliche Zufuhr von täglich 2 g RNS erzeugten Hyperurikämie vergleichend untersucht werden.

Es wurden die Konzentrationen der Harnsäure im Serum sowie die Aktivitäten der ODC, HGPRT und APRT aus Erythrozyten untersucht. Außerdem wurde der Harnsäure-Mindestpool unter Ciapilom mit demjenigen unter Allopurinolbehandlung verglichen. In der gleichen Versuchreihe wurden die renale Harnsäureausscheidung sowie die Oxypurin- (Hypoxanthin- und Xanthin-) und Orotsäureausscheidung ebenfalls vergleichend unter Allopurinol und Ciapilom untersucht (Wasmer, 1981 (53)).

Es sollte geprüft werden, ob sich diese Parameter unter Ciapilom im Sinne einer urikosurischen, urikostatistischen, einer kombinierten oder einer noch unbekannten Wirkungsweise des Präparates verändern. Ferner sollten die Versuche klären, ob ein Einfluß von Ciapilom auf die Purin- und Pyrimidinsynthese besteht. Dabei wurde geprüft, ob auch unter Ciapilom, wie für Allopurinol berichtet, eine Steigerung der Aktivität der ODC zu beobachten ist. Die Aktivitäten der HGPRT und APRT wurden untersucht, um einen möglichen Einfluß von Ciapilom auf die Reutilisation der Purine zu erkennen. Ein Anstieg ihrer Aktivitäten wäre durch ein Ansteigen der Reutilisation der Purine nach vermehrtem Anfall von Hypoxanthin und Xanthin durch die Hemmung der Xanthinoxidase denkbar. Unter Allopurinolbehandlung wurde jedoch nie eine Veränderung der Aktivitäten der HGPRT und APRT beschrieben. Weiter sollte untersucht werden, welche Wertigkeit dem Ciapilom gegenüber dem Allopurinol zukommt.

4. Methodik

4.1. Versuchspersonen

Der Versuch wurde mit sieben gesunden Versuchspersonen, vier weiblichen und drei männlichen, durchgeführt. Bei allen Probanden waren vor und nach jeder Versuchsperiode Gesamt-Bilirubin, Harnstoff-N, Kreatinin, Harnsäure, K^+ , Fe^{++} , alkalische Phosphatase, GOT und GPT im Serum im Normbereich (Bestimmungen des Zentrallabors für Klinische Chemie der Poliklinik der Universität München).

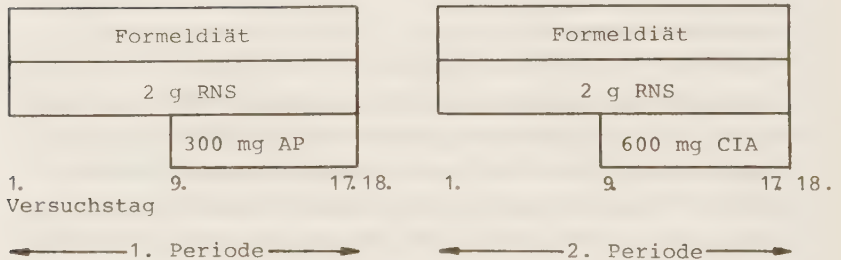
Alter, Größe, Gewicht, Körperoberfläche und Kalorienbedarf sind aus Tabelle 2 ersichtlich. (Siehe auch 4.3.)

4.2. Versuchsablauf

Der Versuch lief in zwei Perioden von je 17 Tagen Dauer, während derer die Versuchspersonen den errechneten Kalorienbedarf in Form einer purinfreien standardisierten Formeldiät zu sich nahmen. Als standardisierte exogene Purinzufuhr wurden täglich 2 g RNS eingenommen, verteilt auf drei gleiche Einzelgaben. Jeweils ab dem 9. Tag jeder Versuchsperiode bis einschließlich zum 17. Tag erhielten die Versuchsteilnehmer zusätzlich entweder täglich 1 x 300 mg Allopurinol oder 1 x 600 mg Ciapilom morgens. Aus Abbildung 9 ist der Versuchsablauf ersichtlich.

Zur übersichtlicheren Darstellung sind jedoch bei der Dokumentation der Ergebnisse und im Hinblick auf die Diskussion die Tabellen und Abbildungen nach der unter-

schiedlichen Medikation (Allopurinol oder Ciapilom) zusammengestellt und nicht nach dem zeitlichen Ablauf der beiden Versuchsperioden. Dieses Vorgehen ist gerechtfertigt, da zwischen den beiden Versuchsabschnitten eine Zeitspanne von 6 Wochen lag und damit keine Beeinflussung des zweiten Abschnitts durch den ersten mehr möglich war (Rundles, 1966 (46) und Information des Herstellers zur Pharmakokinetik von Ciapilom).



(Einige Versuchspersonen bekamen in der 1. Periode Ciapilom und in der 2. Periode Allopurinol) (s. Tab.2)

Abbildung 9: Versuchsverlauf

Tabelle 2: Nummer, Name, Geschlecht, Versuchsfolge, Alter, Größe, Gewicht, Körperoberfläche und errechneter Kalorienbedarf der 7 Versuchspersonen

Nr.	Name	Geschl.	Versuchsfolge		Alter	Größe [cm]	Gewicht [kg]	Körperober- fläche [m ²]	Kalorienbed. (errechnet) [kcal]
1	F.B.	♀	AP	CIA	22	170	51,0	1,58	2135
2	H.A.	♀	AP	CIA	25	175	64,0	1,78	2400
3	R.E.	♂	AP	CIA	23	179	68,5	1,86	2785
4	K.M.	♀	CIA	AP	23	159	42,0	1,39	1880
5	K.C.	♀	CIA	AP	22	170	51,0	1,58	2135
6	S.W.	♂	CIA	AP	28	178	65,0	1,82	2600
7	W.G.	♂	CIA	AP	24	170	69,0	1,79	2660

Die Versuchspersonen erhielten täglich im Labor den Tagesbedarf an Formeldiät und RNS, ab dem 9. Tag zusätzlich Ciapilom bzw. Allopurinol (siehe auch 4.3. und 4.4.). Am 1., 3., 5., 7., 9., 11., 13., 15., 17. und 18. Tag wurde den nüchternen Versuchspersonen morgens im Labor 10 ml Venenblut in heparinisierte Röhrchen (Thrombophob^R, Nordmark Werke, Hamburg) abgenommen. Die Röhrchen standen bei der Blutentnahme und bei der weiteren Verarbeitung in Eis, um eine Abnahme der Enzymaktivitäten zu verhindern. Gleich anschließend wurde das Blut mit 600 g bei 4°C 15 Minuten lang zentrifugiert. Das Serum wurde vorsichtig in neue Röhrchen pipettiert und bis zur Durchführung der Bestimmungen tiefgefroren.

Die Erythrozyten wurden zweimal mit kalter isotoner Kochsalzlösung gewaschen, der Überstand wurde nach dem Zentrifugieren abpipettiert. Die Erythrozyten wurden anschließend bis zur Durchführung der Bestimmungen tiefgefroren.

4.3. Formeldiät

Bei bekanntem Gewicht (kg) und bekannter Körpergröße (cm) kann die Körperoberfläche jeder Versuchsperson aus dem Nomogramm nach D. und E.F. Du Bois (1926 (9)) entnommen werden.

Mit Hilfe von Alter, Geschlecht und Körperoberfläche läßt sich nach der Tabelle von Boothby (aus Zöllner, 1957 (57)) der Grundumsatz pro Versuchsperson und Tag in kcal berechnen. Durch Multiplikation mit dem Faktor 1,6 ergibt sich nach Zöllner (1957 (57)) der auf unsere Probanden zutreffende Arbeitumsatz, deren

Tätigkeit sich auf Studium und Laborarbeit erstreckte. Unsere Versuchspersonen waren angehalten, während des Versuchs keinen Leistungssport zu betreiben und größere körperliche Belastungen zu vermeiden. Der so ermittelte Arbeitsumsatz ist identisch mit dem Kalorienbedarf der Versuchspersonen. (Siehe Tabelle 2)

Die pro Versuchsperson erforderliche Kalorienmenge verteilte sich zu 15 % auf Eiweiß, zu 30 % auf Fett und zu 55 % auf Kohlenhydrate. Als Eiweißträger diente Magermilchsprühpulver (MMSP) (Bayerische Milchindustrie, München), als Kohlenhydratträger Maltodextrin (Maizena, Hamburg), als Fett Livio-Speiseöl (Union Deutsche Lebensmittelwerke, Hamburg).

Unter Berücksichtigung des tatsächlichen Eiweißgehaltes des MMSP von 51 % (laut Analyse des Herstellers), eines zusätzlichen Kohlenhydratgehaltes des MMSP von 36 %, des Kohlenhydratgehaltes von Maltodextrin von 97,5 % und des Fettgehaltes von Livioöl von 100 % wurden aus den Brennwerten für Kohlenhydrate und Eiweiß von 4,1 kcal/g und für Fett von 9,3 kcal/g die anteiligen Mengen der drei Substanzen in g für jede Versuchsperson errechnet. (Siehe Tabelle 2)

Die benötigten Mengen an Eiweiß, Kohlenhydraten und Fett wurden mit 500 bis 750 ml Wasser (je nach Kalorienbedarf und Menge der trockenen Substanzen) vermischt und in drei Portionen abgefüllt. Die Formel diät wurde täglich frisch zubereitet und den Versuchspersonen mitgegeben. Jeden zweiten Tag erhielten die Probanden zusätzlich eine Kapsel Multibionta forte^R (Merck, Darmstadt). Die Versuchspersonen wurden angehalten, die Diät vollständig in etwa drei gleich-

mäßig über den Tag verteilten Portionen zu sich zu nehmen. Um Gewichtsschwankungen auszuschließen, wurden die Versuchsteilnehmer täglich morgens im Labor gewogen. Es traten keine wesentlichen Gewichtsveränderungen auf (0 - 3,7 % des Ausgangsgewichts).

Als Geschmackskorrigentien für die Formeldiät waren Natriumcyclamat, Vanillepulver und Zimt erlaubt. Außerdem durfte täglich ein Apfel von etwa 150 g gegessen werden. Zur Elektrolytsubstitution war ungesüßtes Mineralwasser erlaubt. Tee und Kaffee (ohne Milch und Zucker) durften in beliebiger Menge getrunken werden.

Es war strengstens verboten, ohne vorherige Rücksprache mit dem Versuchsleiter Pharmaka einzunehmen. Eine während der Versuchszeit aufgetretene Obstipation wurde mit Tirgon^R (Woelm Pharma, Eschwege) und eine Pharyngitis mit erheblicher Heiserkeit mit Larypront^R (Heinr. Mack, Illertissen) behandelt.

4.4. Einnahme der RNS und der Medikamente Ciapilom und Allopurinol

Vom 1. bis zum einschließlich 17., dem letzten Versuchstag jeder Periode, erhielt jede Versuchsperson täglich 2 g RNS. Die pulverisierte RNS (Boehringer, Mannheim) wurde genau abgewogen (Analysenwaage Mettler H 54, Mettler, Gießen) und gleichmäßig in neun Oblatenkapseln (Kuechle, Günzburg) gefüllt. Diese Kapseln erhielten die Probanden täglich morgens mit der Formeldiät im Labor. Die RNS war in drei Portionen, täglich 3 x 3 Kapseln einzunehmen.

Ab dem 9. Versuchstag nahmen die Versuchspersonen zusätzlich täglich 1 x 300 mg Allopurinol (Zyloric 300^R, Wellcome, Burgwedel) bzw. 1 x 600 mg Ciapilom (2 Kapseln zu je 300 mg) jeweils morgens mit der ersten Portion der Formeldiät ein.

4.5. Bestimmungsmethoden

4.5.1. Harnsäure im Serum

Die Bestimmungen wurden im Plasma gemacht. Bei allen enzymatischen Bestimmungen der Harnsäure sind jedoch die Werte im Serum und im Plasma identisch. Wegen des häufigeren Sprachgebrauchs wird im folgenden "Serum-harnsäure" für "Harnsäure im Plasma" verwandt.

Die Bestimmung der Harnsäure im Serum wurde nach der von Zöllner (1963 (59)) modifizierten Methode von Praetorius und Poulsen (1953 (44)) durchgeführt. Diese Modifikation führt zu einer wesentlichen Vereinfachung und Zeitersparnis gegenüber der Methode von Praetorius und Poulsen ohne Einbuße an Genauigkeit.

Das Prinzip dieser enzymatischen Bestimmung beruht auf der Einwirkung von Uricase auf Harnsäure, die dabei in Allantoin umgewandelt wird. Gleichzeitig verschwindet die typische Absorptionsbande bei 293 nm. Der Extinktionsabfall ist der Harnsäurekonzentration direkt proportional.

4.5.1.1. Reagentien

- Glycinpuffer-Stammlösung, 0,66 M, pH 9,3 (bezogen aus der Apotheke der Poliklinik der Universität München)
Glycinpuffer-Gebrauchslösung: hergestellt aus der Stammlösung durch Verdünnung 1 : 10 mit aqua bidest.
- Uricase, 75 U/Ampulle (Loevens Kemiske Fabrik, Ballerup, Dänemark)
Uricase-Gebrauchslösung: Uricase in 25 ml der Glycinpuffer-Gebrauchslösung aufgelöst.
Die Eigenextinktion dieser Uricase-Gebrauchslösung liegt nach Zöllner (1963 (59)) zwischen 0,010 und 0,015. In unseren Versuchen ergab sich eine durchschnittliche Eigenextinktion von 0,0138 (Standardabweichung 0,0038).

4.5.1.2. Durchführung der Serumharnsäure-Bestimmungen

Die Röhrchen mit dem tiefgefrorenen Serum wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und geschüttelt. Zur Herstellung der Harnsäurebestimmungsreihen wurde jeweils 1,0 ml des Serums mit Glycinpuffer-Gebrauchslösung in Meßkölbchen auf 25,0 ml aufgefüllt, also 1 : 25 verdünnt. Zur Vermeidung einer Oxydation der Harnsäure im alkalischen Milieu an Luft wurden die Kölbchen nach dem Auffüllen sofort mit Parafilm^R (Marathon Corp., Manasha, USA) verschlossen, gemischt und zügig weitergearbeitet.

Bei der Erarbeitung einer Eichkurve, der Herstellung der Ansätze und den photometrischen Messungen hielten wir uns genau an die Angaben von Zöllner (1963 (59)).

Wir stellten folgende beiden Ansätze zur Photometrie her:

Bestimmung der Eigenextinktion des Enzyms (E_F):

- 1) 2,0 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung +
1,0 ml Uricase-Gebrauchslösung
- 2) 3,0 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung

Bestimmung des Extinktionsabfalls (E_{HS}) im Serum:

- 1) 2,0 ml verdünntes Serum +
1,0 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung
- 2) 2,0 ml verdünntes Serum +
1,0 ml Uricase-Gebrauchslösung

Alle Ergebnisse wurden als Doppelbestimmungen am Spektralphotometer (Spectrophotometer Model 25, Beckman, USA) bei 293 nm (UV-Bereich) mit Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke ermittelt. In Stichproben wurden einige Messungen nach 15 Minuten wiederholt, um sicher zu gehen, daß die Uricasereaktion abgeschlossen war.

4.5.1.3. Berechnung der Harnsäurekonzentration im Serum

Die photometrische Ablesung der Serumverdünnung vor der Uricaseeinwirkung gegen die Serumverdünnung nach der Uricaseeinwirkung (E_{HS}) berücksichtigt nicht, daß nur in einem Ansatz Uricase mit der Eigenextinktion E_F zugesetzt ist. Der Extinktionsdifferenz E_{HS} ist somit die Eigenextinktion E_F der Uricase zuzuzählen. Die Summe ($E_F + E_{HS}$) ist proportional der Harnsäurekonzentration. Der molare Extinktionskoeffizient der Harnsäure beträgt 0,0745 für 1 µg/ml in der Küvette mit 10 mm Schichtdicke. Es gilt:

$$\text{Harnsäurekonzentration} = \frac{E_F + E_{HS}}{0,0745} \quad \mu\text{g/ml}$$

Durch Aufrundung des Extinktionskoeffizienten und unter Berücksichtigung der Serumverdünnung ergibt sich für die Harnsäurekonzentration (HS) im Serum:

$$HS_{\text{Serum}} = \frac{(E_F + E_{HS}) \times 3 \times 25 \times 100}{0,075 \times 2 \times 1000} \text{ mg/100 ml}$$

$HS_{\text{Serum}} = (E_F + E_{HS}) \times 50 \text{ mg/100 ml}$
--

(nach Zöllner, 1963 (59))

4.5.1.4. Berechnung des Harnsäurepools

Die Mindestmenge Harnsäure, die sich im Körper befindet, hat Zöllner (1960 (58)) den Mindestpool der Harnsäure genannt. Unter der Annahme, daß Harnsäure frei durch die extrazelluläre Flüssigkeit diffundiert und in einer geringeren Konzentration (50 % der Serumharnsäurekonzentration) Eingang in die Erythrozyten findet, beträgt der entsprechende Harnsäureraum: Plasmavolumen + interstitielles Volumen + 0,5 x Erythrozytenvolumen. Unter Zugrundelegung dieser Angaben und der Angaben von Parker et al. (1958 (43)) sowie eines Hämatokrits von 45 % ergibt sich für die Größe des Harnsäureraums:

$$0,234 \times \text{KG} + 0,5 \times \frac{0,45}{0,55} \times 0,05 \times \text{KG} = 0,254 \times \text{KG}$$

(KG = Körpergewicht)

Als Maßstab für die Verteilung der Harnsäure im Extrazellulärraum wurde der Bromidraum gewählt, weil die Harnsäure sich in physiologischen pH-Bereichen wie ein einwertiges Anion verhält.

Aus dem Harnsäureraum kann die Mindestmenge Harnsäure im Körper, der Mindest-Harnsäurepool berechnet werden:

$$0,254 \times \text{KG} \times \text{Serumharnsäure (mg/l)}$$

Als Normalwert eines 70 kg schweren Mannes gibt Zöllner (1960 (58)) einen Pool von 910 mg an. Er hat diesen Wert Mindestpool genannt, da auch in anderen Geweben geringe Mengen Harnsäure nachgewiesen werden können, der Gesamtpool der Harnsäure also noch etwas größer ist.

4.5.1.5. Berechnung des Harnsäureumsatzes und der Harnsäuresynthese

Der tägliche Umsatz des Harnsäurepools kann ebenfalls näherungsweise angegeben werden. Nach Untersuchungen von Zöllner et al. (1972 (63)) erfolgen etwa 80 % der Harnsäureausscheidung über die Nieren. 20 % der Harnsäure werden über den Darm eliminiert (Gröbner u. Zöllner, 1977 (24)). Nach Untersuchungen mittels einer Isotopenverdünnungstechnik beträgt die enterale Harnsäureausscheidung etwa ein Drittel der gesamten Harnsäureausscheidung. Der tägliche Harnsäureumsatz kann demnach annähernd mit folgender Formel berechnet werden (Löffler, 1980 (38)):

$$\begin{aligned} \text{Harnsäureumsatz (mg/Tag)} = \\ \text{Renale Harnsäureausscheidung (mg/Tag)} \times 1,25 \end{aligned}$$

Unter standardisierten Ernährungsbedingungen sind im steady state sowohl der Harnsäurepool wie auch die renale Harnsäureausscheidung und damit auch der daraus errechnete tägliche Harnsäureumsatz konstante Größen. Das heißt, im steady state entspricht die Harnsäuresynthese dem Harnsäureumsatz (Löffler, 1980 (38)).

4.5.2. Messung der Aktivität der Orotidyldecarboxylase (ODC) aus Erythrozyten

Die Messung der Aktivität der Orotidyldecarboxylase wurde nach der bei Kelley und Beardmore (1970 (28)), Gröbner und Zöllner (1979 (25)) und Zöllner et al., (1978 (61)) angegebenen Methode nach Appel (1968 (1)) durchgeführt.

Die ODC katalysiert die für die de-novo-Pyrimidinsynthese essentielle Umwandlung von OMP in UMP. Bei der Decarboxylierung, die irreversibel ist, wird von jedem umgewandelten Molekül OMP ein Molekül CO_2 abgegeben. Zur Aktivitätsmessung wird OMP verwendet, bei dem die Carboxylgruppe radioaktiv markiert ist (OMP-7- ^{14}C). Bei der durch ODC katalysierten Reaktion wird so markiertes $^{14}\text{CO}_2$ abgespalten (siehe Abbildung 10). Dieses wird an Hyaminhydroxid gebunden. In einem Szintillationszähler wird die Intensität der radioaktiven Strahlung gemessen. Sie ist der Menge der abgespaltenen $^{14}\text{CO}_2$ -Moleküle und damit der spezifischen Aktivität der ODC proportional.

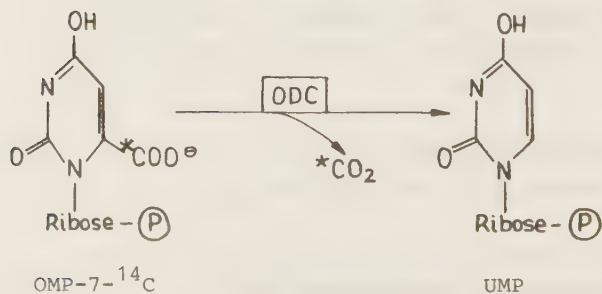


Abbildung 10: Abspaltung von $^{14}\text{CO}_2$ bei der ODC-Reaktion (*C = ^{14}C)

4.5.2.1. Reagentien

- 10 mM Tris-Cl-Puffer, pH 7,4
- 0,01 M Kalium-Phosphatpuffer, pH 7,4
- 4,0 M Perchlorsäure
- Szintillationsflüssigkeit: 9,45 g PPO, 0,1952 g POPOP, Toluol ad 2500 ml (PPO = 2,5-Diphenyl-oxazol, POPOP = 2,2'-para-Phenylene-bis-(5-Phenyloxazol)
(alles bezogen aus der Apotheke der Poliklinik der Universität München)
- Hyamin-Hydroxid (Packard, Downers Grove, Ill., USA)
- OMP-7-¹⁴C, spezifische Aktivität 34,9 mCi/mmol
(New England Nuclear, Boston, USA).

4.5.2.2. Durchführung

Die tiefgefrorenen Erythrozyten (Bereitung siehe 4.2.) wurden aufgetaut, wieder eingefroren und nochmals aufgetaut und dadurch lysiert. Das Hämolytat wurde in Schlauchmembranen (Union Carbide Corp., Chicago, USA) zwei Stunden lang bei + 4°C gegen 10 mM Tris-Cl-Puffer, pH 7,4, dialysiert.

Zur Durchführung der Aktivitätsbestimmung wurde das Hämolytat 1 : 10 mit Kalium-Phosphatpuffer verdünnt. Das OMP-7-¹⁴C wurde 1 : 20 mit Kalium-Phosphatpuffer verdünnt.

An den Gummistopfen zum Verschluß der Reagenzgläser wurden Kunststoffkölbchen befestigt, in die 0,2 ml Hyaminhydroxid pipettiert wurden. Die Reagenzgläser für den Ansatz wurden in Eis gestellt, um eine Abnahme der Enzymaktivität zu vermeiden. In die Reagenzgläser wurden 50 µl der Hämolytatverdünnung gegeben. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl der Isotopenverdünnung

gestartet (Stoppuhr) und die Reagenzgläser sofort mit dem vorbereiteten Gummistopfen mit Hyaminhydroxid verschlossen. Das Inkubationsgemisch wurde bei 37°C geschüttelt. Nach exakt 15 Minuten wurde die Reaktion mit 0,2 ml 4 M Perchlorsäure gestoppt. Die Perchlorsäure wurde dazu mit einer Kanüle durch den Gummistopfen des Reagenzglases injiziert. Anschließend wurde der Ansatz noch weitere 60 Minuten bei 37°C geschüttelt, um das gelöste CO₂ auszutreiben.

Die Auffanggeräte mit dem Hyaminhydroxid wurden von den Gummistopfen abgeschnitten, außen abgewischt und in Szintillationsgefäße mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Zählung erfolgte in einem Packard-Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, Downers Grove, Ill., USA) für 15 Minuten. Die Ausbeute der Zählung (counting efficiency) liegt nach Appel (1968 (1)) und Messungen des Labors bei 75 %, nach Kelley und Beardmore (1970 (28)) bei 81 %.

4.5.2.3. Berechnung

Die Freisetzung des ¹⁴CO₂ ist proportional der Inkubationszeit und der Eiweißkonzentration des Dialysats (Kelley u. Beardmore, 1970 (28)). Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951 (41)). (Siehe 4.5.5.)

Durch Korrektur der Inkubationszeit auf 1 Stunde und unter Berücksichtigung der Zählausbeute von 75 %, der Verdünnung, der spezifischen Aktivität der OMP-¹⁴C und des Faktors 1 µCi = 2,22 x 10⁶ dpm ergibt sich für die Berechnung der Aktivität der ODC folgende Formel:

Aktivität der ODC =	$\frac{\text{counts} \times 0,4}{5,811 \times \text{Protein (in } \mu\text{g)}}$	$\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \times \text{h}}$
---------------------	--	---

(Berechnung siehe Anhang 8.1.) (Eiweißbestimmung siehe 4.5.5.)

4.5.3. Messung der Aktivität der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT)

Die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase katalysiert in Gegenwart von Phosphoribosyl-Pyrophosphat (PRPP) und Mg^{++} -Ionen die Bildung von IMP und GMP aus Hypoxanthin bzw. Guanin (siehe Abbildung 3 und Tabelle 1).

Die Aktivität der HGPRT wurde mit der mikroradiochemischen Methode (Kelley et al., 1967 (31)) bestimmt. Dabei wird radioaktiv markiertes Hypoxanthin ($HX-8-^{14}C$) von HGPRT zu $IMP-^{14}C$ umgewandelt. Das entstandene $IMP-^{14}C$ wird von $HX-^{14}C$ mittels Hochspannungselektrophorese getrennt. Seine radioaktive Strahlung wird im Szintillationszähler gemessen und daraus die spezifische Aktivität der HGPRT ermittelt.

4.5.3.1. Reagentien

- 10 mM Tris-Cl-Puffer, pH 7,4
 - 0,5 M Tris-Cl-Puffer, pH 7,4
 - 0,1 M $MgCl_2$
 - 0,1 M Äthylendiamintetraacetat (EDTA)
 - 50 mM Natriumboratpuffer, pH 8,5 (18,1 g Na-Borat, 5,16 g Borsäure, 1,50 g EDTA, aqua bidest. ad 4000 ml)
 - Szintillationsflüssigkeit (siehe 4.5.2.1.)
- (alles bezogen aus der Apotheke der Poliklinik der Universität München)
- 1 mM Mg -PRPP (Boehringer, Mannheim)
 - Hypoxanthin 1,80 mM (Boehringer, Mannheim)
 - IMP (Inosin-5'-monophosphat) (Boehringer, Mannheim)
 - Hypoxanthin-8- ^{14}C (spez. Aktivität 55,3 mCi/mmol, 1,84 mM) (New England Nuclear, Boston, USA)

Aus IMP wurde eine Trägerlösung hergestellt (2 mg IMP/ml aqua bidest.). Aus den anderen Reagentien wurden drei verschiedene Gebrauchslösungen hergestellt:

- A) 1 Teil $\hat{=}$ 2 ml 0,1 M $MgCl_2$
2 Teile $\hat{=}$ 4 ml 0,5 M Tris-Cl-Puffer, pH 7,4
2 Teile $\hat{=}$ 4 ml aqua bidest.
- B) 10 mM PRPP (aus 1 mM der Firma Boehringer, Mannheim, hergestellt: 3,34 mg PRPP ad 0,426 ml 10 mM Tris-Cl-Puffer, pH 7,4. Auf Eis angesetzt)
- C) Hypoxanthin-¹⁴C: Verdünnung 1 : 10 mit kalter Hypoxanthinlösung von gleicher Molarität. Daraus resultiert eine spezifische Aktivität der Gebrauchslösung von 5,53 mCi/mmol.

Aus den Gebrauchslösungen wurde die für die Aktivitätsmessung einzusetzende Substratlösung hergestellt. Sie bestand aus

- 5 Teilen von A $\hat{=}$ 25 μ l pro Probe
- 2 Teilen von B $\hat{=}$ 10 μ l pro Probe
- 3 Teilen von C $\hat{=}$ 15 μ l pro Probe

sodaß pro Probe 50 μ l der Substratlösung eingesetzt wurden.

4.5.3.2. Durchführung

Die tiefgefrorenen Erythrozyten wurden hämolysiert und dialysiert wie unter 4.5.2.2. beschrieben. Das dialysierte Hämolysat wurde 1 : 50 mit 10 mM Trispuffer verdünnt, es wurden zu 50 μ l Hämolysat 2,45 ml Puffer in auf Eis stehende Reagenzgläser pipettiert.

Von dieser Hämolysat-Verdünnung wurden, wieder auf Eis, 50 μ l in neue Reagenzgläser pipettiert. Durch Zugabe von 50 μ l der Substratlösung und Inkubieren des Ansatzes bei 37°C wurde die Reaktion in Gang gesetzt. Nach exakt 20 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μ l 0,1 M EDTA gestoppt und die Gefäße wieder auf Eis gestellt.

Zur Elektrophorese wurde Elektrophoresepapier (Nr. 2043b, Firma Schleicher & Schüll, Kassel) in Streifen von 102 cm Länge geschnitten und in 50 mM Natriumboratlösung (enthält EDTA) getränkt. Quer über das Papier wurde eine Startlinie gezogen mit Markierungspunkten in gleichmäßigen Abständen (mindestens 5 cm). An diesen Punkten wurden 20 μ l der IMP-Trägerlösung aufgetragen. Nach dem Trocknen der Carrier-Substanz wurden auf die selben Stellen 20 μ l des Inkubationsgemisches aufgetragen. Nach erneutem Trocknen wurde das Papier mit der Startlinie zur Kathode in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Hochvolt-Papier-Elektrophorese (Firma Hölzel-Technik, Dorfen/Obb.) lief 30 Minuten bei einer Spannung von 8000 V und ca. 35 mA.

In der Elektrophorese wurde das gebildete IMP-¹⁴C zusammen mit der IMP-Trägersubstanz vom Hypoxanthin-¹⁴C, das am Auftragungsort zurückblieb, getrennt und lief zur Anode. Nach dem Trocknen im Abzug wurden die IMP-Flecken unter UV-Licht lokalisiert, mit Bleistift umrandet, ausgeschnitten und in Szintillationsgläschen mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Die Radioaktivitätsmessung erfolgte im Packard-Tri-Carb-Flüssigkeitsszintillationszähler. Die Zählausbeute liegt nach Kelley et al. (1967 (31)) und Bestimmungen des Labors bei 60 %.

Die Bildung von IMP- ^{14}C ist der Inkubationszeit und der Eiweißkonzentration in der HämolySATverdÜnnung proportional. Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951 (41)) (siehe 4.5.5.).

Unter Berücksichtigung der Zeit, der ZählAusbeute von 60 %, der spezifischen Aktivität von Hypoxanthin- ^{14}C , der Teilauftragung, der VerdÜnnung des radioaktiven Substrates und des Faktors $1 \mu\text{Ci} = 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$ ergibt sich für die Berechnung der Aktivität der HGPRT folgende Formel:

Aktivität der HGPRT	$= \frac{0,135 \times \text{counts}}{\text{spez. Aktivität von HX-}^{14}\text{C (in mCi/mmol)} \times \text{Protein im Inkubationsansatz (in mg)}}$	$\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \times \text{h}}$
------------------------	---	---

(Berechnung der Formel siehe Anhang 8.2.)

4.5.4. Messung der Aktivität der Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT)

Die Adenin-Phosphoribosyltransferase katalysiert in Gegenwart von PRPP und Mg^{++} -Ionen die Bildung von AMP aus Adenin (siehe Abbildung 3 und Tabelle 1).

Die Bestimmung der Aktivität der APRT erfolgte im wesentlichen nach derselben Methode wie die HGPRT, nur wird Adenin- ^{14}C eingesetzt. Durch die APRT wird das markierte Adenin in AMP- ^{14}C umgewandelt. Dieses wird vom Adenin- ^{14}C mittels Elektrophorese getrennt und seine radioaktive Strahlung gemessen.

Es wurden die gleichen Reagentien wie unter 4.5.3.1. beschrieben eingesetzt. Aber statt Hypoxanthin- ^{14}C wurde Adenin-8- ^{14}C , 1,7 mM, mit der spezifischen Aktivität von 55,6 mCi/mmol eingesetzt (New England Nuclear, Boston, USA). Zum Gebrauch wurde die heiße Lösung mit kalter Adeninlösung von gleicher Molarität (Boehringer, Mannheim) 1 : 10 verdünnt. Als Carriersubstanz wurde Adenosin-5'-monophosphat (AMP, Boehringer, Mannheim) in aqua bidest. gelöst (2 mg/ml).

Behandlung der Erythrozyten, Inkubation, Elektrophorese und Szintillationszählung wurden wie bei der Bestimmung der HGPRT-Aktivität durchgeführt. Die Zählausbeute lag wiederum bei 60 % (Kelley et al., 1967 (31) und Bestimmung des Labors).

Die Berechnung erfolgt analog der Formel für die Aktivität der HGPRT (siehe Anhang 8.2.):

Aktivität	0,135 x counts		nmol
der APRT =	spez. Aktivität	Protein im In-	mg x h
	von Adenin- ^{14}C	kubationsansatz	
	(in mCi/mmol)	(in mg)	

4.5.5. Bestimmung des Eiweißgehalts

Die Aktivitäten der Enzyme ODC, HGPRT und APRT werden bezogen auf mg Protein. Dazu wurde jeweils der Proteinanteil in den Erythrozyten-Dialysaten gemessen. Die Eiweißmessung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951 (41)), die ein hohes Maß an Genauigkeit aufweist und auch für kleine Mengen bzw. hohe Verdünnungen geeignet ist.

Sie geht davon aus, daß Eiweiß in alkalischem Medium mit Kupferionen unter Bildung eines Farbkomplexes eine Biuretreaktion eingeht. Zugegebenes Folin-Phenol-Reagens wird reduziert, wobei der Protein-Kupfer-Komplex an Farbintensität zunimmt. Das Reagens wird während der Reaktion inaktiviert, die Farbveränderung entwickelt sich aber noch einige Minuten weiter. Sie erhält ein Maximum an Intensität, wenn die Lösung mit einer Mischung aus NaOH und Na_2CO_3 bei pH 10 gepuffert ist und möglichst schnell durch Schütteln komplett gemischt wird (Lowry et al. 1951 (41)). Die Absorption des Farbkomplexes kann bei 498 nm photometrisch bestimmt werden und ist dem Proteingehalt proportional.

4.5.5.1. Reagentien

- 2 % Na-Carbonat-Lösung (Na_2CO_3) in 0,1 N NaOH (1)
- 0,5 % $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ (2)
- 1 % K-Na-Tartrat (3)

Herstellung einer Gebrauchslösung (Reaktionsgemisch): Zu 100 ml von (1) werden je 1ml von (2) und 1ml von (3) gemischt.

- Isotone Kochsalzlösung

(alles bezogen aus der Apotheke der Poliklinik der Universität München)

- Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagens (Merck, Darmstadt)
Gebrauchslösung: Verdünnung des Folin-Reagens 1 : 1 mit aqua bidest.
- Rinder-Serum-Albumin (BSA, Fa. Behring-Werke, Marburg)
Gebrauchslösung: 1 mg BSA wird in 1 ml aqua bidest. aufgelöst (entspricht: 100 mg %).

4.5.5.2. Durchführung

Zur Eichung wurden verschiedene Konzentrationen der BSA-Gebrauchslösung gemessen und eine Eichkurve (siehe 4.3.5.3.) erstellt.

Für die Bestimmung der Aktivität der ODC wurde das Erythrozytendialysat 1 : 20 verdünnt mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 (siehe 4.5.2.1.). 10 µl dieser HämolySATverdünnung wurden mit 190 µl physiologischer NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 200 µl aufgefüllt.

Für die Bestimmung der Aktivitäten der HGPRT und der APRT wurde das Dialysat 1 : 50 mit demselben Puffer (vergleiche 4.5.3.1.) verdünnt. Für die Eiweißmessung wurden 20 µl dieser HämolySATverdünnung mit 180 µl physiologischer NaCl-Lösung ad 200 µl aufgefüllt.

Diesen HämolySAT-Lösungen bzw. den Eichlösungen wurden 2,0 ml des Reaktionsgemisches aus alkalischer Na_2CO_3 -Lösung, Cu-Sulfat und K-Na-Tartrat zugegeben, geschüttelt und der Ansatz 10 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Danach wurden 2,0 ml des Folin-Phenol-Reagens zugesetzt und sofort geschüttelt, um möglichst schnell eine komplette Durchmischung zu erreichen. Nach 30 Minuten wurde die Extinktion am Photometer bei 498 nm abgelesen.

4.5.5.3. Eichkurve

Zur Erstellung einer Eichkurve für die Proteinmessung wurden aus der 100 mg % BSA-Gebrauchslösung verschiedene Konzentrationen hergestellt. Dazu wurden 0, 10,

20, 50, 100, 150 und 200 μ l BSA-Gebrauchslösung jeweils entsprechend ad 200 μ l mit physiologischer Kochsalzlösung aufgefüllt. Nach der Folin-Phenol-Reaktion wurden die Extinktionen der verschiedenen Eiweißkonzentrationen gemessen (siehe Tabelle 3) und eine Eichkurve erstellt (siehe Abbildung 11). Aus dieser konnte unter Berücksichtigung der Verdünnungen der entsprechende Eiweißgehalt der Proben in μ g abgelesen werden.

Tabelle 3: Extinktionen (E) für definierte Eiweißkonzentrationen, Einzelwerte (E_1 und E_2), Mittelwerte ($\bar{E}$)

BSA-Lösung 100 mg% (μ l)	NaCl-Lösung 0,9 %ig (μ l)	E_1	E_2	$\bar{E}$	Protein (μ g)
10	190	0,034	0,054	0,044	10
20	180	0,088	0,098	0,093	20
50	150	0,217	0,215	0,216	50
100	100	0,400	0,401	0,400	100
150	50	0,562	0,568	0,565	150
200	0	0,728	0,720	0,725	200

(BSA = Rinder-Serum-Albumin)

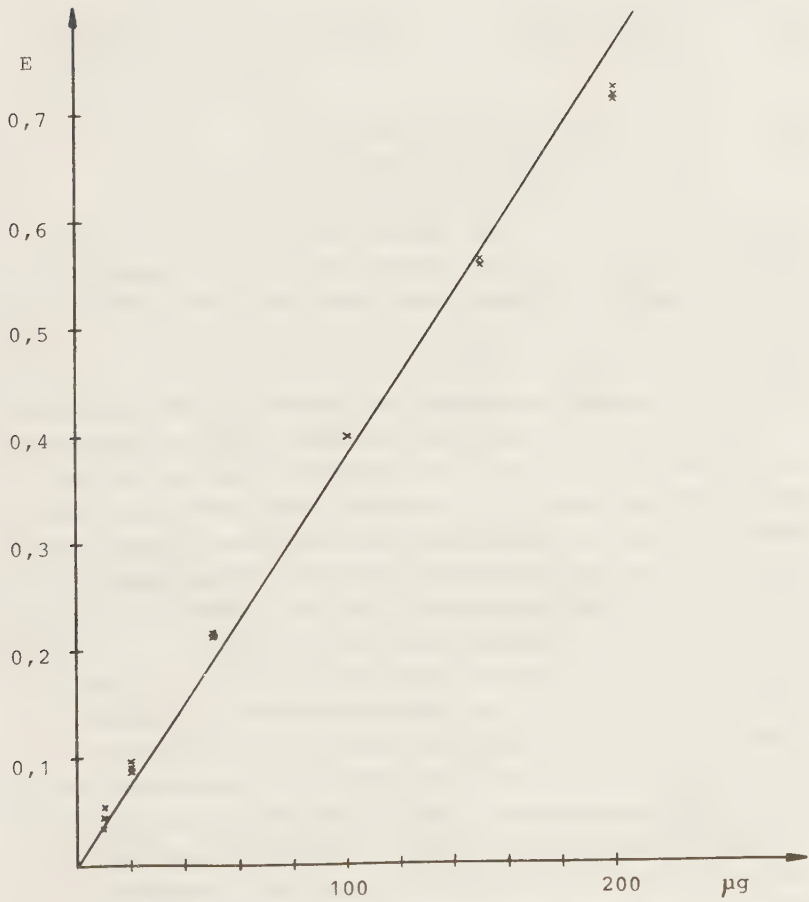


Abbildung 11: Eichkurve zur Eiweißbestimmung nach
Lowry et al., 1951 (41)

5. Ergebnisse

5.1. Serumharnsäure

5.1.1. Versuchsperiode mit Allopurinol

(siehe Tabelle 4 und Abbildung 12)

Die Ausgangswerte für die Serumharnsäure lagen bei Versuchsbeginn für die Allopurinolgruppe bei durchschnittlich 4,0 mg/100 ml. Der höchste Wert war 5,55 mg/100 ml, der niedrigste 1,65 mg/100 ml.

Unter achttägiger Formeldiät und gleichzeitiger Einnahme von täglich 2 g RNS stieg die Serumharnsäure an. Ein steady state war ab dem 5. Tag erreicht. Zur Berechnung wurden die Werte des 5., 7. und 9. Tages gemittelt. Es ergab sich ein mittlerer Anstieg der Serumharnsäure auf 5,9 mg/100 ml. Das entspricht einer Steigerung von 48 % gegenüber dem Ausgangswert bei Versuchsbeginn.

Nach zusätzlicher Verabreichung von täglich 300 mg Allopurinol ab dem 9. Tag sank der Serumharnsäurespiegel schnell. Ein steady state war schon nach 4 Tagen Allopurinoleinnahme erreicht. Als Mittelwert errechnete sich (aus den Werten des 13., 15., 17. und 18. Tages) 3,8 mg/100 ml. Die Serumharnsäure wurde also innerhalb von 4 Tagen um 2,1 mg/100 ml gesenkt. Das ist eine Verminderung um 36 % gegenüber den Werten unter RNS.

Allopurinol senkte bei den meisten Versuchspersonen die Serumharnsäure unter den Ausgangswert, also stärker als sie durch die Gabe von RNS erhöht worden war. Die durchschnittliche Minderung nach Allopurinoleinnahme gegen-

über dem Mittelwert des ersten Versuchstages beträgt 0,2 mg/100 ml. Das entspricht einer Senkung von 5 % gegenüber dem Ausgangswert.

5.1.2. Versuchsperiode mit Ciapilom (siehe Tabelle 5 und Abbildung 13)

Der mittlere Ausgangswert dieser Gruppe lag etwas höher als derjenige der Allopurinolgruppe. Die Einzelwerte lagen aber nicht so weit auseinander. Zu Versuchsbeginn errechnete sich für die Serumharnsäure ein Mittelwert von 4,6 mg/100 ml. Der höchste Wert war 6,35 mg/100 ml, der niedrigste 3,55 mg/100 ml.

Während der achttägigen Einnahme von 2 g RNS/die zur Formeldiät stieg die Serumharnsäure an. Ein steady state war ebenfalls ab dem 5. Tag erreicht. Es wurde aus den Werten des 5., 7. und 9. Tages errechnet und ergab einen mittleren Anstieg der Serumharnsäure auf 6,3 mg/100 ml. Das entspricht einer Steigerung von 40 % gegenüber dem Ausgangswert.

Nach zusätzlicher Einnahme von täglich 600 mg Ciapilom ab dem 9. Versuchstag trat eine Abnahme der Serumharnsäurekonzentration ein, die langsamer erfolgte als unter Allopurinol. Ein steady state war am 15. Versuchstag erreicht, nach sechs Tagen Einnahme von Ciapilom. Der Mittelwert lag bei 4,8 mg/100 ml. Die Serumharnsäure war also nach sechs Tagen um 1,5 mg/100 ml gesenkt worden. Das stellt eine Verminderung um 23 % gegenüber dem steady state von 6,3 mg/100 ml nach ausschließlicher Gabe von RNS dar.

Tabelle 4: Serumharnsäure unter Allopurinol, Einzelwerte, Mittelwerte, steady states, Mittlerer Fehler (S_x^-), Standardabweichung (s)

F O R M E L D I Ä T		
2 g R N S		
		300 mg Allopurinol

	1	3	5	7	9	11	13	15	17	18	Tag	
FB	4,95	7,05	6,05	6,10	6,15	4,60	4,05	4,10	4,05	3,90	Serumharnsäure in mg/100 ml	
HA	4,05	4,70	5,55	5,65	5,75	5,05	3,45	3,60	3,85	3,70		
KM	3,70	4,50	5,20	4,85	5,80	3,50	3,15	3,15	2,75	3,25		
KC	1,65	2,40	3,90	3,85	4,20	3,35	2,55	2,50	2,55	2,10		
RE	3,75	5,85	7,25	6,70	7,05	5,95	4,55	4,40	3,75	4,90		
SW	5,55	5,90	6,10	6,50	6,45	5,00	4,50	4,05	4,20	4,25		
WG	4,25	6,35	7,20	6,70	6,95	5,80	5,10	4,35	4,10	4,45		
$\bar{x}$	4,0	5,3	5,9	5,8	6,1	4,8	3,9	3,7	3,8	3,8		
steady state:		5,9										3,8
S_x^-	0,46	0,58	0,44	0,41	0,36	0,39	0,34	0,26	0,30	0,35		
s	1,23	1,54	1,17	1,07	0,96	1,02	0,90	0,70	0,80	0,92		

F O R M E L D I Ä T	
2 g	R N S
300 mg Allopurinol	

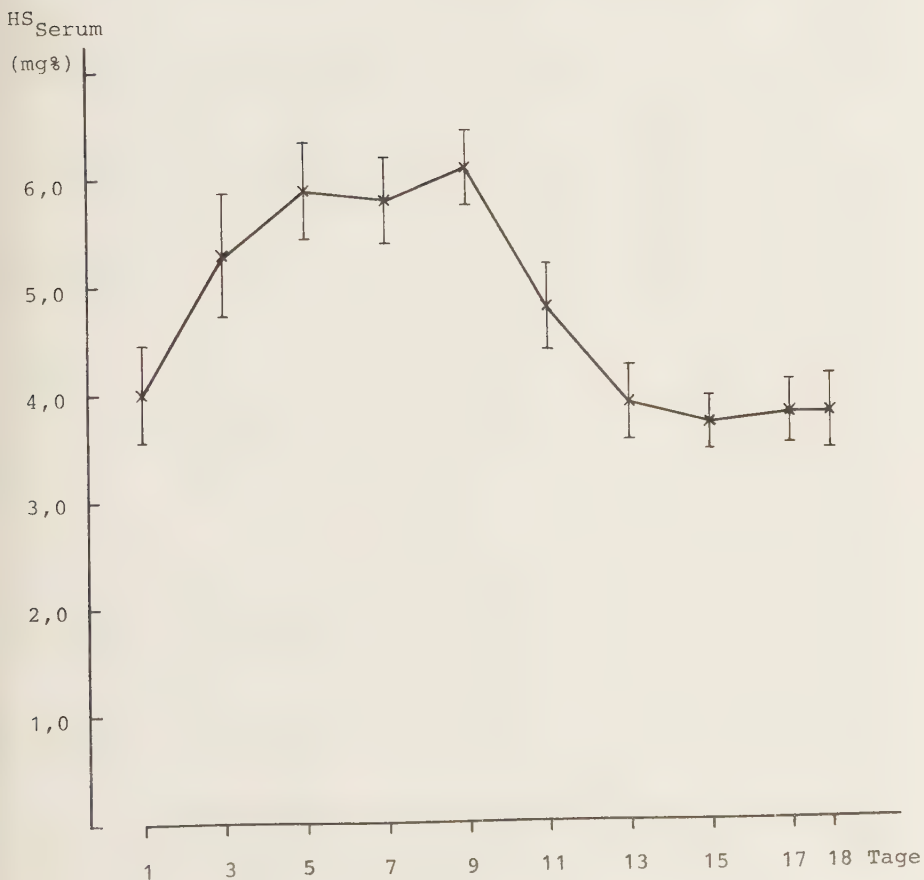


Abbildung 12: Serumharnsäure unter Allopurinol,
Mittelwerte und Mittlerer Fehler

Tabelle 5: Serumharnsäure unter Ciapilom, Einzelwerte, Mittelwerte, steady states, Mittlerer Fehler ($S_{\bar{x}}$), Standardabweichung (s)

F O R M E L D I Ä T		
2 g R N S		
600 mg Ciapilom		

	1	3	5	7	9	11	13	15	17	18	Tag
											Serumharnsäure in mg/100 ml
FB	3,85	6,55	6,20	6,15	6,50	5,50	4,95	4,80	4,75	5,25	
HA	3,50	4,20	4,65	4,65	4,35	4,55	4,55	4,45	4,50	4,20	
KM	3,55	6,25	5,95	5,75	6,00	4,75	4,45	3,85	4,25	3,35	
KC	3,75	5,05	5,40	5,45	5,20	4,25	4,15	3,80	3,75	4,05	
RE	6,35	5,55	6,60	7,15	7,30	6,45	5,85	6,30	6,40	6,00	
SW	5,70	6,25	6,50	7,30	7,25	6,70	6,35	5,45	4,95	4,95	
WG	5,60	6,45	8,05	7,90	7,75	6,60	5,85	5,20	5,40	5,40	
$\bar{x}$	4,6	5,8	6,2	6,3	6,3	5,5	5,2	4,8	4,9	4,7	
steady state:			6,3						4,8		
$S_{\bar{x}}$	0,45	0,33	0,40	0,44	0,47	0,40	0,32	0,34	0,32	0,35	
s	1,20	0,87	1,06	1,16	1,23	1,05	0,85	0,90	0,86	0,92	

F O R M E L D I Ä T	
2 g	R N S
600 mg Ciapilom	

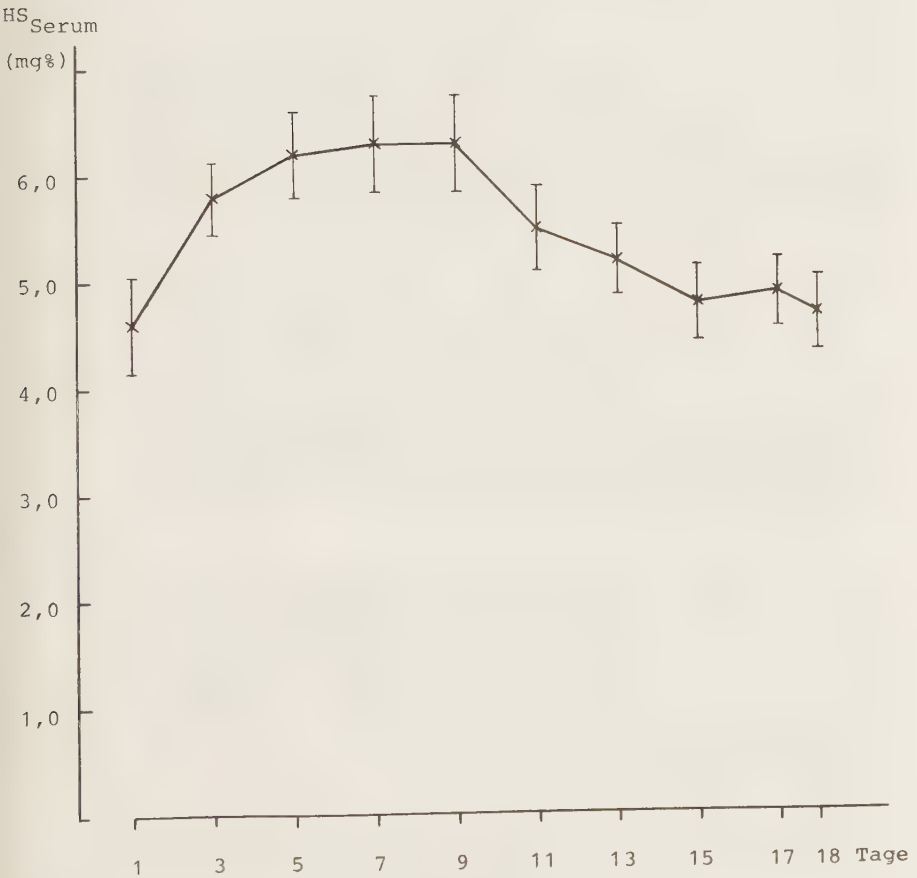


Abbildung 13: Serumharnsäure unter Ciapilom,
Mittelwerte und Mittlerer Fehler

Im Vergleich zum mittleren Ausgangswert des ersten Versuchstages lag der Durchschnittswert nach neuntägiger Behandlung mit 600 mg Ciapilom um 0,2 mg/100 ml höher. Der mittlere Endwert der Serumharnsäure lag damit um 4,3 % über dem Ausgangswert.

5.1.3. Berechnung des Harnsäure-Mindestpools

Nach der unter 4.5.1.4. beschriebenen Formel von Zöllner (1960 (58)) wurde die Mindestmenge der im Körper befindlichen Harnsäure errechnet. Das Körpergewicht in kg der Versuchspersonen ist der Tabelle 2 entnommen, die Werte für die Serumharnsäure den Tabellen 4 und 5.

5.1.3.1. Der Harnsäurepool unter Allopurinol (siehe Tabelle 6 und Abbildung 14)

Zu Beginn des Versuchs lag der mittlere Ausgangswert der Allopurinolgruppe für den Harnsäurepool bei 603 mg Harnsäure. Der größte Pool war 916 mg, der kleinste 214 mg Harnsäure.

Nach acht Tagen Formeldiät und 2 g RNS/die errechnete sich ein steady state für den Harnsäurepool von 896 mg, welches am 5. Tag erreicht war. Zur Berechnung wurden die Werte des 5., 7. und 9. Tages gemittelt. Die Poolzunahme betrug 293 mg Harnsäure bzw. 48 % gegenüber dem Ausgangswert.

Nach der zusätzlichen Einnahme von täglich 300 mg Allopurinol sank der Harnsäuregehalt des Pools auf ein steady state von 573 mg (Mittelwerte aus den durchschnittlichen Poolgrößen des 15., 17. und 18. Tages). Die Verminderung des Harnsäurepools gegenüber der nach

Tabelle 6: Harnsäurepool unter Allopurinol, Einzelwerte, Mittelwerte, steady states, Mittlerer Fehler ($S_{\bar{x}}$) und Standardabweichung (s)

F O R M E L D I Ä T + 2 g R N S										
300 mg Allopurinol										
Tag	1	3	5	7	9	11	13	15	17	18
FB	641	913	784	790	797	596	525	531	525	505
HA	658	764	902	918	934	821	561	585	626	601
KM	395	480	554	517	619	373	336	336	293	347
KC	214	311	505	499	544	434	330	324	330	272
RE	652	1018	1261	1166	1227	1035	792	766	826	852
SW	916	974	1007	1073	1065	826	743	669	693	702
WG	745	1113	1262	1174	1218	1016	894	762	718	780
$\bar{x}$	603	796	896	877	915	729	597	567	573	579
steady state:	896				573					
$S_{\bar{x}}$	87	113	116	108	104	101	84	69	76	82
s	231	298	306	286	274	266	221	184	201	218

Harnsäurepool in mg

F O R M E L D I Ä T + 2 g R N S

300 mg Allopurinol

HS-Pool

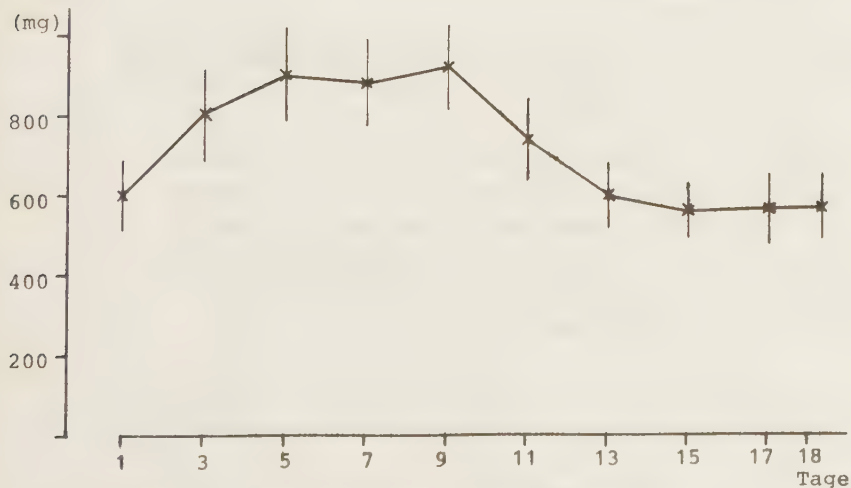


Abbildung 14: Harnsäurepool unter Allopurinol, Mittelwerte und Mittlerer Fehler

alleiniger RNS-Einnahme erreichten Größe beträgt 323 mg, was einer Abnahme des Harnsäuregehalts im Körper um 36 % entspricht.

5.1.3.2. Der Harnsäurepool unter Ciapilom (siehe Tabelle 7 und Abbildung 15)

Bei der Ciapilomgruppe lag der mittlere Ausgangswert für den Harnsäurepool bei 708 mg. Der größte Wert war 1105 mg und der kleinste 379 mg Harnsäure.

Nach Formeldiät und 2 g RNS/die errechnete sich aus den Werten des 5., 7. und 9. Tages ein mittleres steady state für den Pool von 948 mg Harnsäure. Das entspricht einer Zunahme des Pools um 240 mg bzw. um 34 %.

Nach der Behandlung mit zusätzlich täglich 600 mg Ciapilom war das steady state des Pools, errechnet aus den Werten des 15., 17. und 18. Tages, auf durchschnittlich 732 mg Harnsäure gesunken. Das entspricht einer Verminderung des Pools gegenüber den Werten unter alleiniger RNS-Gabe um 216 mg Harnsäure oder 23 %.

5.1.3.3. Ergebnisse der renalen Harnsäureausscheidung unter Allopurinol und Ciapilom

Die steady states des Harnsäurepools vor der Einnahme von Allopurinol oder Ciapilom und nach der Einnahme dieser Medikamente sind den Ergebnissen der steady states der renalen Harnsäureausscheidung (aus Wasmer, 1981 (53)) zu den entsprechenden Zeitpunkten in Tabelle 8 gegenüber gestellt.

Tabelle 7: Harnsäurepool unter Ciapilom, Einzelwerte, Mittelwerte, steady states, Mittlerer Fehler ($S_{\bar{x}}$) und Standardabweichung (s)

F O R M E L D I Ä T + 2 g R N S										
600 mg Ciapilom										
Tage	1	3	5	7	9	11	13	15	17	18
FB	499	848	803	797	842	712	641	622	615	680
HA	569	683	756	756	707	740	740	723	731	683
KM	379	667	635	613	640	507	475	411	453	357
KC	486	654	699	706	673	551	538	492	486	525
RE	1105	966	1148	1244	1270	1122	1018	1096	1114	1044
SW	941	1032	1073	1205	1197	1106	1048	900	817	817
WG	981	1130	1411	1385	1358	1157	1025	911	946	946
$\bar{x}$	708	854	932	958	955	842	784	736	737	722
steady state:			948						732	
$S_{\bar{x}}$	110	73	108	117	117	106	93	93	91	90
s	291	193	285	309	309	280	245	247	242	237

Harnsäurepool in mg

F O R M E L D I Ä T + 2 g R N S										
600 mg Ciapilom										

HS-Pool

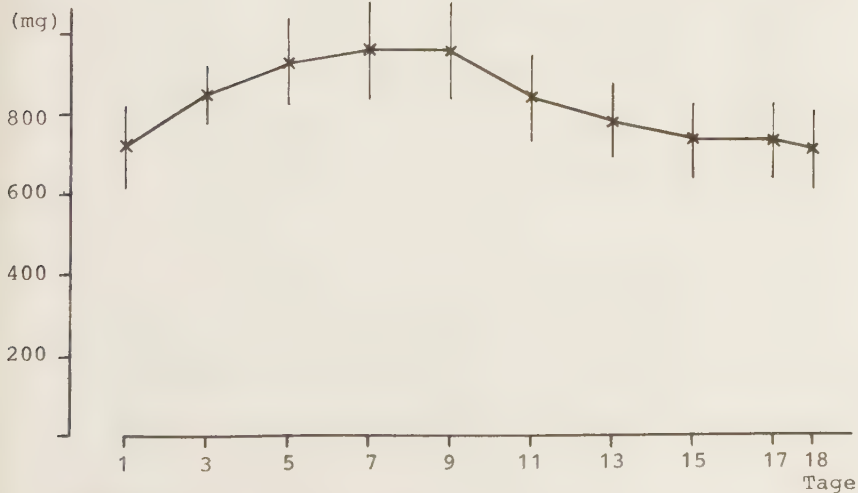


Abbildung 15: Harnsäurepool unter Ciapilom, Mittelwerte und Mittlerer Fehler

Tabelle 8: Steady states des Harnsäurepools und der renalen Harnsäureausscheidung vor und nach Gabe von Ciapilom bzw. Allopurinol (Werte aus Wasmer, 1981 (53))

	FORMELDIÄT + 2g RNS		FORMELDIÄT + 2g RNS		
	AP		CIA		
HS-Pool (mg)	896	573	948	732	HS-Pool (mg)
Urin-HS (mg)	569	320	588	473	Urin-HS (mg)

Tabelle 9: Harnsäurepool und Harnsäureumsatz bzw. Harnsäuresynthese im steady state, Umsatzrate k

	FORMELDIÄT + 2g RNS		FORMELDIÄT + 2g RNS		
	AP		CIA		
HS-Pool (mg)	896	573	948	732	HS-Pool (mg)
HS-Umsatz (HS-Synthese) (mg/die)	711	400	735	591	HS-Umsatz (HS-Synthese) (mg/die)
k (Tage ⁻¹)	0,79	0,69	0,78	0,81	Umsatzrate k

5.1.3.4. Harnsäureumsatz und Harnsäuresynthese

Im steady state entspricht der tägliche Harnsäureumsatz des Pools der Harnsäuresynthese pro Tag. Er kann mit der Formel nach Löffler (1980 (38)) errechnet werden (zur Berechnung des Umsatzes aus der renalen Harnsäureausschei-

dung siehe 4.5.1.5.). Harnsäurepool und Harnsäureumsatz im steady state vor und nach der Einnahme von Allopurinol bzw. Ciapilom sind in Tabelle 9 zusammengestellt. Die Umsatzrate k (Anteil des Harnsäurepools, der pro Tag umgesetzt wird) ist ebenfalls in Tabelle 9 angegeben.

5.2. Aktivität der ODC

5.2.1. Versuchsperiode mit Allopurinol

(siehe Tabelle 10 und Abbildung 16)

Unter der kontinuierlichen Behandlung mit Allopurinol ist die Hemmung der Orotidyldecarboxylase (ODC) (Gröbner u. Zöllner, 1975 (21, 22); Kelley et al., 1970 (28)) gefolgt von einem Anstieg der Aktivität der ODC (Fox et al., 1971 (14); Beardmore et al., 1972 (2)), der auf eine Enzymstabilisierung zurückzuführen ist (Fox et al., 1971 (14); Gröbner et al., 1975 (19); Zöllner et al., 1978 (61)). (Siehe 2.3.)

Diese bekannten Wirkungen von Allopurinol auf die Aktivität der ODC bestätigten sich bei den Messungen aus den Erythrozyten von zwei Versuchspersonen. Auf weitere Bestimmungen wurde deshalb verzichtet. Der Durchschnitt der Mittelwerte vor der Gabe von Allopurinol betrug 0,50 nmol/mg Protein und Stunde (Werte vom 1. bis 9. Tag). In den ersten sechs Tagen unter der Behandlung mit täglich 300 mg Allopurinol (Werte vom 11., 13. und 15. Tag) war die Aktivität der ODC im Mittel 0,59 nmol/mg Protein und Stunde. Ab dem 7. bis zum 9. Tag der Allopurinolbehandlung (Werte vom 17. und 18. Tag) war ein Anstieg der mittleren Aktivität auf 0,75 nmol/mg Protein und Stunde zu messen.

Tabelle 10: Aktivitäten der ODC in nmol/mg Protein x h
unter Allopurinol, Einzelwerte, Mittelwerte
x (n=2), steady states

F O R M E L D I Ä T + 2 g R N S										
										300 mg Allopurinol
Tage	1	3	5	7	9	11	13	15	17	18
KM	0,63	0,60	0,52	0,61	0,70	0,72	0,71	0,74	0,91	0,85
KC	0,39	0,36	0,39	0,34	0,44	0,46	0,51	0,42	0,60	0,61
$\bar{x}$	0,45	0,48	0,46	0,48	0,57	0,59	0,61	0,58	0,76	0,74
steady states	0,50					0,59			0,75	

Tabelle 11: Aktivitäten der ODC in nmol/mg Protein x h
unter Ciapilom, Einzelwerte, Mittelwerte x
(n=7), steady states, Mittlerer Fehler $S_{\bar{x}}$
und Standardabweichung s

F O R M E L D I Ä T + 2 g R N S										
										600 mg Ciapilom
Tage	1	3	5	7	9	11	13	15	17	18
FB	0,07	0,09	0,10	0,15	0,22	0,21	0,32	0,18	0,20	0,25
HA	0,16	0,17	0,14	0,14	0,16	0,14	0,18	0,16	0,17	0,23
KM	0,53	0,54	0,51	0,54	0,57	0,50	0,56	0,63	0,62	0,69
KC	0,40	0,39	0,39	0,35	0,29	0,39	0,39	0,46	0,48	0,51
RE	0,31	0,33	0,26	0,26	0,37	0,34	0,34	0,33	0,38	0,33
SW	0,19	0,15	0,13	0,20	0,21	0,24	0,24	0,27	0,35	0,33
WG	0,17	0,19	0,18	0,14	0,21	0,21	0,25	0,20	0,33	0,20
$\bar{x}$	0,26	0,27	0,24	0,25	0,29	0,29	0,33	0,32	0,36	0,36
steady states	0,26					0,31			0,36	
$S_{\bar{x}}$	0,06	0,06	0,06	0,06	0,05	0,05	0,05	0,07	0,06	0,07
s	0,16	0,16	0,15	0,15	0,14	0,13	0,12	0,17	0,15	0,17

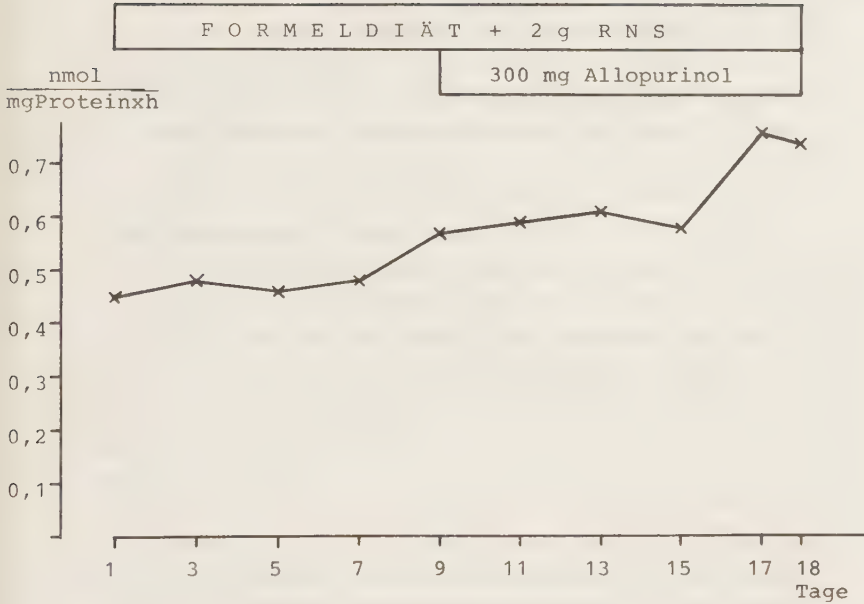


Abbildung 16: Aktivitäten der ODC unter Allopurinol, Mittelwerte (n=2)

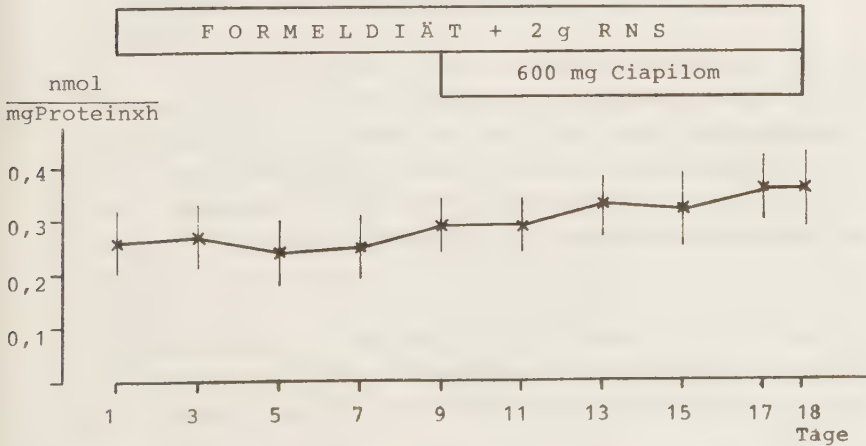


Abbildung 17: Aktivitäten der ODC unter Ciapilom, Mittelwerte (n=7), Mittlerer Fehler

5.2.2. Versuchsperiode mit Ciapilom

(siehe Tabelle 11 und Abbildung 17)

Die Aktivität der ODC unter der Behandlung mit Ciapilom wurde bei allen sieben Versuchspersonen bestimmt. Der Durchschnitt der Mittelwerte vor der Behandlung mit Ciapilom betrug 0,26 nmol/mg Protein und Stunde (Werte vom 1. bis 9. Tag). In den ersten sechs Tagen unter der Behandlung mit täglich 600 mg Ciapilom war die Aktivität der ODC im Mittel 0,31 nmol/mg Protein und Stunde. Ab dem 7. Tag der Behandlung mit Ciapilom lag die mittlere Aktivität bei 0,36 nmol/mg Protein und Stunde.

5.3. Aktivität der HGPRT

(siehe Tabellen 12 u. 13 und Abbildungen 18 u. 19)

Die Aktivitäten der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) unter der Behandlung mit Allopurinol und Ciapilom wurden bei je zwei Versuchspersonen gemessen. Es trat keine wesentliche Veränderung der Aktivität auf, sodaß auf weitere Bestimmungen verzichtet wurde.

Vor und während der Behandlung mit täglich 300 mg Allopurinol schwankten die täglichen Mittelwerte um einen Gesamtmittelwert von 77,9 nmol/mg Protein und Stunde (Standardabweichung $s_{\bar{x}} = 3,6$). Einzelwerte, tägliche Mittelwerte und der Gesamtmittelwert mit Standardabweichung sind Tabelle 12 und Abbildung 18 zu entnehmen.

Auch während der Behandlung mit täglich 600 mg Ciapilom wichen die Werte für die Aktivität der HGPRT nicht wesentlich von denen vor der Medikation ab. Der Gesamt-

mittelwert war 78,2 nmol/mg Protein und Stunde, um den die täglichen Mittelwerte mit einer Standardabweichung von $s_{\bar{x}} = 4,8$ streuten. Einzelwerte, tägliche Mittelwerte und Gesamtmittelwert mit Standardabweichung sind aus Tabelle 13 und Abbildung 19 zu entnehmen.

5.4. Aktivität der APRT

(siehe Tabellen 14 u. 15 und Abbildungen 20 u. 21)

Die Aktivität der Adenin-Phosphoribosyltransferase (APRT) unter der Behandlung mit Allopurinol und Ciapilom wurde bei einer Versuchsperson bestimmt. Da keine wesentliche Aktivitätsänderung auftrat, wurde auf weitere Bestimmungen verzichtet.

Vor und während der Behandlung mit täglich 300 mg Allopurinol schwankten die Werte für die Aktivität der APRT um den Mittelwert von 11,3 nmol/mg Protein und Stunde mit einer Standardabweichung von $s_{\bar{x}} = 2,1$. Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung sind aus Tabelle 14 ersichtlich, Abbildung 20 gibt eine graphische Darstellung.

Vor und während der Behandlung mit täglich 600 mg Ciapilom streuten die Werte für die Aktivität der APRT um den Mittelwert von 13,9 nmol/mg Protein und Stunde mit der Standardabweichung $s_{\bar{x}} = 3,7$. Einzelwerte, Mittelwert und Standardabweichung sind Tabelle 15 zu entnehmen, die graphische Darstellung gibt Abbildung 21 wieder.

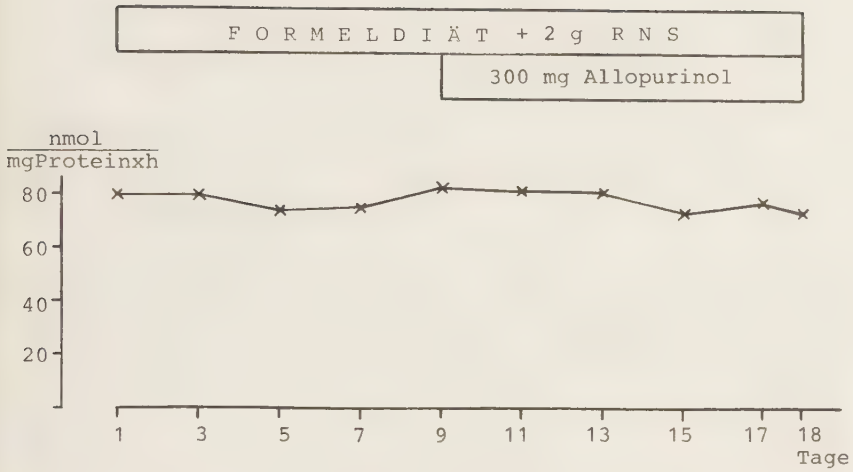


Abbildung 18: Aktivitäten der HGPRT unter Allopurinol

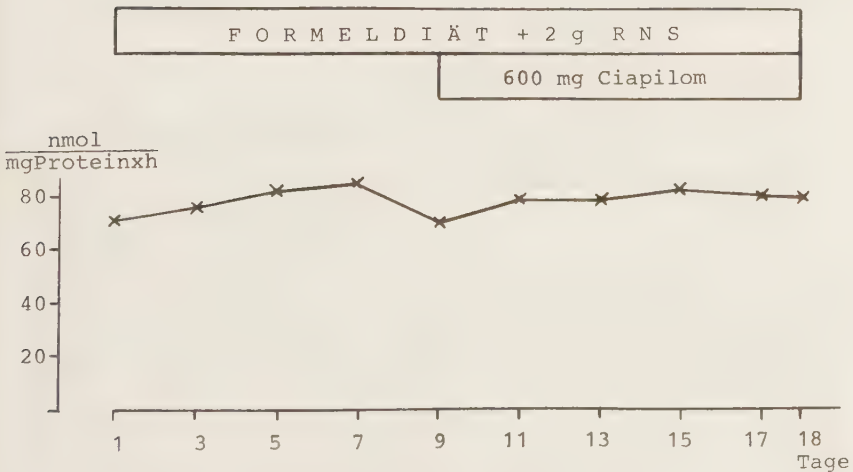


Abbildung 19: Aktivitäten der HGPRT unter Ciapilom

FORMELDIÄT + 2 g RNS

300 mg Allopurinol

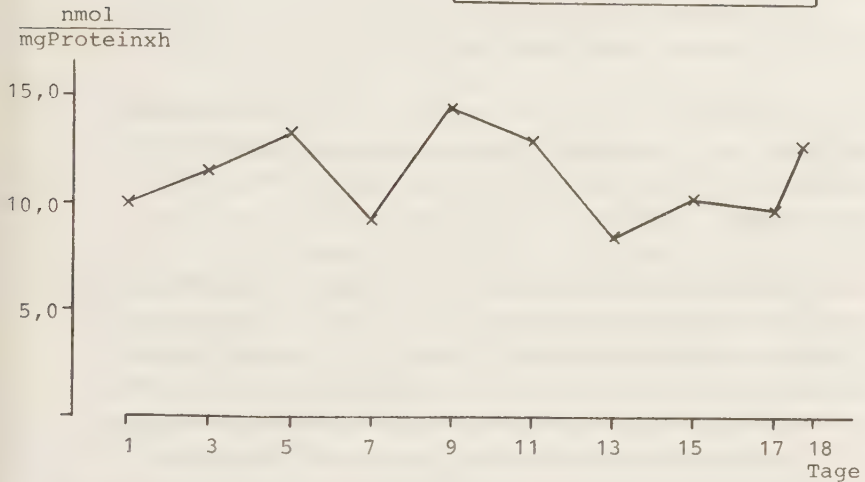


Abbildung 20: Aktivität der APRT unter Allopurinol

FORMELDIÄT + 2 g RNS

600 mg Ciapilom

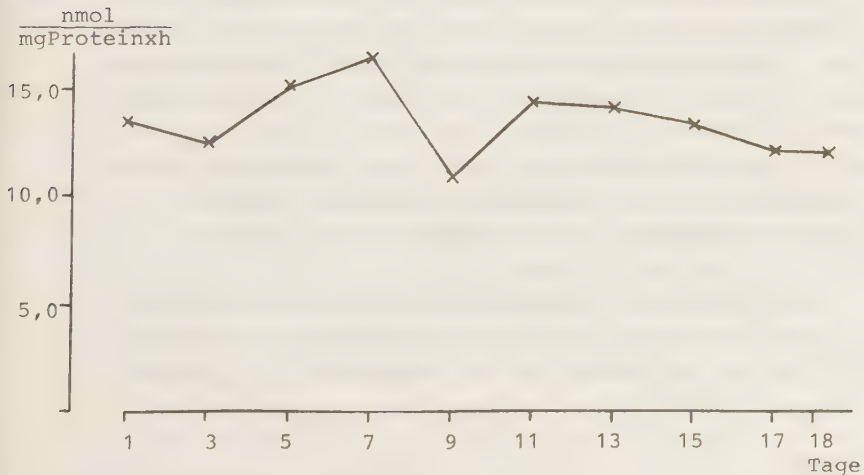


Abbildung 21: Aktivität der APRT unter Ciapilom

6. Diskussion

6.1. Diskussion der Methoden

6.1.1. Harnsäurebestimmung im Serum

Die angewandte Bestimmungsmethode für die Serumharnsäure nach Zöllner (1963 (59)) ist eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung nach Praetorius und Poulsen (1953 (44)).

Mit dieser Methode ist eine exakte quantitative Bestimmung der Harnsäurekonzentration möglich. Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung durchgeführt, wobei sich eine sehr gute Übereinstimmung der Doppelwerte ergab. Bei der Erstellung einer Eichkurve wurden bei ebenfalls sehr gut übereinstimmenden Doppelwerten die eingesetzten Harnsäuremengen quantitativ wiedergefunden. Das von uns verwendete Spektralphotometer (siehe 4.5.1.2.) war also zuverlässig (andernfalls wäre es bei der Kleinheit der Extinktionswerte zweckmäßig gewesen, anstatt der verwendeten 10-mm-Küvetten mit 20-mm-Küvetten zu arbeiten und dies bei der Berechnung zu berücksichtigen).

Außerdem muß den Tatsachen, daß der Enzymleerwert (E_F) einen verhältnismäßig großen Anteil des Gesamtwerts ausmacht und daß gegen den Leerwert direkt abgelesen wird, dadurch Rechnung getragen werden, daß mit geeichten Pipetten sehr präzise gearbeitet wird. Die Eigenextinktion der Ansätze ist ziemlich groß und geht bei ungenauem Arbeiten als Fehler in die Ergebnisse ein.

Nach Versuchen von Zöllner (1963 (59)) haben Unterschiede in der Eiweißkonzentration der gemessenen Seren keinen Einfluß auf die Ergebnisse der Bestimmung. Bei genauem

Arbeiten und unter Beachtung der genannten möglichen Fehlerquellen kann durch diese Methode der Zeitaufwand bei der enzymatischen Harnsäurebestimmung ohne Einbuße an Genauigkeit gegenüber der Originalmethode verringert werden.

6.1.2. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz

Zur Bestimmung von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz stehen zwei grundsätzlich verschiedene Methoden zur Verfügung. Einmal können diese Größen bei Kenntnis der Serumharnsäurekonzentration, der renalen Harnsäureausscheidung und des Körpergewichts näherungsweise errechnet werden. Zum andern lassen sie sich mit der Isotopenverdünnungsmethode aus dem Isotopengehalt der Urinharnsäure nach intravenöser Gabe markierter Harnsäure ermitteln (Löffler, 1980 (38)).

Die näherungsweise Berechnung des Harnsäurepools nach Zöllner (1960 (56)) aus Harnsäureraum, Plasmaharnsäurekonzentration und Körpergewicht setzt einen linearen Zusammenhang zwischen Plasmakonzentration und Poolgröße voraus. Dieser wurde von Scott et al. (1969 (49)) mit statistischen Methoden nachgewiesen. Bei der Berechnung der Harnsäurekonzentration des Pools mit Hilfe der Plasmakonzentration wird dabei $1 \text{ l} = 1 \text{ kg}$ gesetzt.

Zöllner (1960 (58)) bezeichnet die mit Hilfe seiner Formel errechneten Werte als "Mindestpool", da auch in anderen Geweben geringe Mengen Harnsäure nachgewiesen werden können. Dadurch liegen die Werte des so berechneten Mindestpools in der Regel etwas niedriger als die bei den gleichen Personen aus Isotopenversuchen ermittelten

Ergebnisse, stimmen aber ansonsten recht gut mit diesen überein (Löffler, 1980 (38); Wyngaarden et al., 1978 (55); Zöllner, 1960 (58)).

Die Berechnung des täglichen Umsatzes des Harnsäurepools als Produkt aus renaler Harnsäureausscheidung und dem Faktor 1,25 - 1,5 geht davon aus, daß mit steigender oder fallender Serumharnsäurekonzentration die renal und enteral ausgeschiedenen Anteile des Umsatzes prozentual unverändert bleiben. Auch darf sie bei Anwendung urikosurisch wirkender Maßnahmen nicht herangezogen werden. Außerdem gibt es eine individuelle Schwankung der über die Nieren und den Darm ausgeschiedenen Anteile des Harnsäureumsatzes. Körperliche Aktivität, vermindertes Urinvolumen und Nahrungspurine und -proteine beeinflussen den Harnsäureumsatz ebenfalls. Jedoch erlauben die standardisierten Ernährungsbedingungen der Versuchsanordnung mit einer völlig purinfreien flüssigen Formel-diät und exakt definierter Zugabe von Purinkörpern in chemisch reiner Form einen Vergleich von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz im steady state. Nur im steady state entspricht die tägliche Synthese der Harnsäure dem täglichen Harnsäureumsatz (Zusammenfassung bei Löffler, 1980 (38)). Um den verschiedenen Einfluß von Allopurinol und Ciapilom auf die Synthese- bzw. Umsatz-rate im steady state zu untersuchen, ist die Methode hinlänglich genau (siehe Ergebnisse aus Isotopenversuchen anderer Autoren unter 6.2.1.2.). Eine Aussage über die verschiedene Beeinflussung der endogenen Purinsynthese mit der Reutilisation der Purine und der exogenen Uratquote war bei der gegebenen Versuchsanordnung nicht möglich.

6.1.3. Orotidyldecarboxylase

Vom Zeitpunkt der Blutentnahme an wurden die Erythrozyten gekühlt weiterverarbeitet (Reagenzgläser über Eis, Waschen mit kalter NaCl-Lösung, Kühlzentrifuge, Ansatz zur Bestimmung über Eis, Dialyse bei + 4°C), um eine Minderung der Enzymaktivität möglichst zu verhindern.

Die Durchführung der Bestimmungen erfolgte exakt nach den Angaben von Appel (1968 (1)) und Kelley u. Beardmore (1970 (28)). Danach ist die Freisetzung von $^{14}\text{CO}_2$ proportional der Zeit und der Eiweißkonzentration. Die angegebenen Reaktionszeiten wurden mit der Stoppuhr gemessen und genau eingehalten. Nach Beendigung der Reaktion durch Injektion von 0,2 ml 4 M Perchlorsäure (Insulinspritze) wird noch gelöstes $^{14}\text{CO}_2$ vollständig ausgetrieben, wenn die Ansätze weitere 60 Minuten geschüttelt werden (Appel, 1968 (1)). (Zur Genauigkeit der Eiweißbestimmung siehe 6.1.6.)

In das Ergebnis geht außerdem noch die Zählausbeute beim Zählen der Szintillationen ein. Appel (1968 (1)) gibt eine Zählausbeute von 75 % an, Kelley u. Beardmore (1970 (28)) nennen 81 %. Eine Bestimmung der Zähl- ausbeute unter den Bedingungen, wie sie bei unserem Versuch vorlagen, ergab einen Wert von 75 %.

Zur Prüfung der Genauigkeit wurden Eichkurven erstellt (Zeit- und Konzentrationskurve). Als Testsubstrat diente ein beliebiges Hämolysat. Zum einen wurde die Reaktion nach 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten Inkubationszeit gestoppt. Zum andern wurden 10, 20, 30, 40 und 50 µl des Hämolysats mit 0,01 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 auf 50 µl aufge-

füllt. Diese verschiedenen Hämolysatverdünnungen waren sowohl in Beziehung zur Zeit als auch zur Proteinkonzentration linear.

6.1.4. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

Um einem Aktivitätsverlust der HGPRT vorzubeugen, wurden die Erythrozyten wie unter 6.1.3. beschrieben gekühlt verarbeitet, dialysiert und angesetzt.

Die Durchführung der Aktivitätsbestimmung erfolgte genau nach den Angaben von Kelley et al. (1967 (31)) und Gröbner und Zöllner (1979 (25)). Die Inkubationszeit von 20 Minuten wurde exakt eingehalten (Stoppuhr) und der Ansatz sofort nach Beendigung der Reaktion mit EDTA ins Eisbad gestellt. Das gebildete IMP-¹⁴C ergab zusammen mit dem Carrier-IMP einen genügend abgrenzbaren Nukleotidflecken auf dem Elektrophoresepapier. Nach Kelley et al. (1967 (31)) zeigt das gebildete markierte IMP zur Inkubationszeit und zur Eiweißkonzentration eine lineare Beziehung. (Zur Genauigkeit der Eiweißbestimmung siehe 6.1.6.). Als counting efficiency werden 60 % angegeben (Kelley et al. 1967 (31)), was auch für unsere Meßbedingungen ermittelt wurde.

6.1.5. Adenin-Phosphoribosyltransferase

Bei der Bestimmung der Aktivität der APRT handelt es sich um die gleiche Methode wie bei der Aktivitätsbestimmung der HGPRT. Es wurden lediglich als Substrat Adenin-¹⁴C und

als Carriersubstanz AMP eingesetzt. Das gebildete AMP-¹⁴C ist nach Kelley et al. (1967 (31)) ebenfalls sowohl in Beziehung zur Zeit als auch zur Proteinkonzentration linear. Die angegebene Zählausbeute von 60 % wurde auch für unsere Messungen ermittelt.

6.1.6. Bestimmung der Eiweißkonzentration

Die Eiweißbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al. (1951 (41)). Die Methode ist außerordentlich genau und erlaubt Messungen bis 0,2 µg Protein. Sie ist 100 mal genauer als die einfache Biuret-Reaktion.

Zwei Schritte führen zum letzten Eiweiß-Farbkomplex. Zuerst geht das Protein mit Kupferionen im alkalischen Medium unter Bildung eines Farbkomplexes eine Biuret-Reaktion ein. Dann wird das zugegebene Folin-Reagens reduziert. Bei pH 10 erreicht der Farbkomplex dabei ein Maximum an Intensität. Jedoch ist das Reagens bei diesem pH nur kurze Zeit reaktiv und wird dann inaktiviert. Die Reaktion des Folin-Ciocalteus-Reagens mit dem Kupfer-Komplex geschieht umso vollständiger, je rascher eine komplette Durchmischung erreicht wird. Schon wenige Sekunden Verzögerung beim Schütteln führen zu einer Verringerung der Farbintensität.

Lipide, Harnsäure, Guanin und Xanthin können bei der Bestimmung interferieren, verursachen aber keine bedeutende Veränderung des Farbkomplexes. Wegen der hohen Meßgenauigkeit ist die Methode besonders für Eiweißbestimmungen bei großen Verdünnungen und kleinen Proteinkonzentrationen und für die Eiweißbestimmung bei Enzymbestimmungen (Lowry et al., 1951 (41)) geeignet.

Für die Erstellung einer Eichkurve, aus der der Eiweißgehalt der Proben entsprechend der jeweiligen Extinktion abgelesen wurde (siehe Abbildung 11), wurde Rinder-Serum-Albumin (BSA) verwendet. 1 μg BSA ist äquivalent 0,97 μg Human-Serumprotein. Bei einem Eiweißgehalt der Proben von 100 bis 150 μg entspricht der Fehler durch Gleichsetzen 3 bis 4,5 μg oder 3 %. Die erstellte Eichkurve ergab eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Eiweißkonzentration.

6.2. Diskussion der Ergebnisse

6.2.1. Vergleiche mit Untersuchungen anderer Autoren

6.2.1.1. Serumharnsäure

Als durchschnittliche Normalwerte für die Serumharnsäure geben Griebisch und Zöllner (1973 (17)) 6,0 mg/100 ml für Männer und 4,35 mg/100 ml für Frauen an. Löffler (1980 (39)) gibt einen für Männer und Frauen gleichen oberen Grenzwert von 6,5 mg/100 ml an, als untere Grenze des Normalwertbereichs der Serumharnsäurekonzentration 2,0 mg/100 ml. Die obere Normgrenze wurde von keiner unserer Versuchspersonen zu Beginn einer der beiden Versuchsperioden überschritten. Die durchschnittlichen Ausgangswerte vor Versuchsbeginn betrugen für die vier weiblichen Versuchspersonen 3,66 mg/100 ml bzw. 3,59 mg/100 ml, für die drei männlichen Versuchspersonen 5,88 mg/100 ml bzw. 4,52 mg/100 ml vor den Versuchsperioden mit Ciapilom bzw. Allopurinol. Die Durchschnittswerte lagen somit jeweils unter den von Griebisch u. Zöllner (1973 (17)) angegebenen Normalwerten der süddeutschen Bevölkerung, was bei ausschließlich jungen, normalgewichtigen Probanden zu erwarten war.

Legt man einer purinfreien isoenergetischen Formeldiät Purine in Form von Ribonukleinsäure zu, so kommt es zu einem dosisabhängigen Anstieg der Serumharnsäure und der Harnsäureausscheidung im Urin. Über eine Spanne von 0 bis 4 g RNS-Zufuhr täglich sind die Anstiege der Serumharnsäure und der renalen Harnsäureausscheidung der der Diät zugesetzten RNS-Menge proportional. Für die Serumharnsäure ergibt sich eine Beziehung in Form der

Geradengleichung:

Serumharnsäure in mg/100 ml = $4,64 + 0,9 \times X$ (mit $X = \text{g RNS/die}$) (Zöllner et al., 1972 (63)). Die mathematische Berechnung ergibt, daß die orale Gabe von 1 g RNS zu einem Anstieg der Serumharnsäure um 0,9 mg/100 ml führt (Gröbner u. Zöllner, 1977 (24)).

In unserem Versuch wurden bei einer purinfreien isoe-nergetischen Formeldiät 2 g RNS gegeben. Es war dem-nach ein Anstieg der Serumharnsäure um 1,8 mg/100 ml zu erwarten. In der Versuchsperiode mit Allopurinol stieg die Konzentration der Serumharnsäure von einem mittleren Ausgangswert von 4,0 mg/100 ml auf ein steady state von 5,9 mg/100 ml, also um 1,9 mg/100 ml. In der Ciapilomperiode war von einem mittleren Ausgangs-wert von 4,6 mg/100 ml ein Anstieg auf ein steady state von 6,3 mg/100 ml, also um 1,7 mg/100 ml, zu messen. Damit stimmen unsere Ergebnisse sehr gut mit den Be-rechnungen von Gröbner u. Zöllner (1977 (24)) überein.

Die durch die Verabreichung von RNS gesteigerte Serum-harnsäure wurde nachfolgend durch die Gabe von 300 mg Allopurinol bzw. 600 mg Ciapilom wieder gesenkt. Meh-rere Autoren führten Ernährungsversuche mit purinarmer oder purinfreier Diät durch. Die dosierte Zugabe von exogenen Purinen mit Hilfe von RNS hat sich dabei be-währt. In mehreren Fällen ist auch die Wirkung von Allopurinol auf die erzielte Erhöhung der Serumharn-säure beschrieben. Die vergleichbaren Ergebnisse der anderen Autoren sind mit den Daten unseres Versuchs in Tabelle 16 zusammengestellt.

Tabelle 16: Serumharnsäurewerte unter standardisierten Ernährungsbedingungen bei verschiedenen Autoren, eigene Ergebnisse unter Allopurinol und Ciapilom

Autor	Diät	Zahl d. VP	RNS (g/die)	Tage	Serum-HS (mg/100 ml)	AP (mg/die)	Tage	Serum-HS (mg/100 ml)
Waslien et al. 1968 (52)	purinfreie Diät	5	2,0 4,0	5 5	6,0 7,7			
Zöllner, Gröbner 1970 (64)	purinarm, Purin-N< 10mg/1000 cal	4	4,0	8	6,5	400	8	2,6
Zöllner, Gröbner 1971 (65)	purinarm, Purin-N< 10mg/1000 cal		4,0			400	9	3,2
Zöllner et al. 1972 (63)	purinfreie Diät	7	2,0 4,0	8 12	5,7 7,3			
Griebsch, Zöllner 1975 (18)	purinarm, 15-32 mg/die Purin-N	8	4,0	12	6,4	300	10	4,7
Gröbner, Zöllner 1977 (23)	purinfreie Formeldiät	7	4,0	5	7,5	400	9	4,6
eigene Ergebnisse	purinfreie Formeldiät	7	2,0 2,0	8 8	5,9 6,3	300 mg AP 600 mg CIA	9 9	3,8 4,8

Die Werte für die durch RNS erreichte Erhöhung der Serumharnsäure stimmen bei der Gabe von 2 g RNS sehr gut mit unseren Ergebnissen überein. Die Werte nach Gabe von 4 g RNS liegen naturgemäß höher. Die von uns erzielte Senkung der Serumharnsäure durch Allopurinol stimmt ebenfalls gut mit den in der Literatur gefundenen Angaben überein. Eine stärkere Harnsäureverminderung als in unserem Versuch wird nur bei der Gabe von 400 mg Allopurinol täglich berichtet. Die durch Gabe von 600 mg Ciapilom erzielten Harnsäurewerte liegen geringfügig über den höchsten nach Allopurinolmedikation berichteten Werten.

6.2.1.2. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz

Die durchschnittliche Größe für den Harnsäurepool von männlichen Normalpersonen wird mit 1200 mg (Schwankungsbereich 860 - 1650 mg) Harnsäure angegeben (Gutman u. Yü, 1965 (26); Scott et al., 1969 (49); Wyngaarden et al., 1978 (55)). Wie bereits angeführt besteht zwischen Poolgröße und Serumkonzentration der Harnsäure ein linearer Zusammenhang. Entsprechend der niedrigeren Serumkonzentration haben Frauen einen kleineren Pool. Wyngaarden u. Kelley (1978 (55)) geben einen Normalwert von 541 bis 687 mg an, nach Löffler (1980 (38)) liegt der Harnsäurepool bei gesunden Frauen im Durchschnitt bei 608 mg und ist demnach ungefähr halb so groß wie derjenige der Männer. Die angegebenen Werte gelten jeweils für Bestimmungen mittels Isotopen.

Unsere Werte wurden aus der Größe des Harnsäureraums bestimmt und liegen deshalb etwas niedriger, da sie wie erwähnt nur dem Mindestpool entsprechen. Als mittlerer

Ausgangswert beider Perioden ergab sich für die männlichen Versuchspersonen ein Pool von 890 mg (652 - 1105 mg Schwankungsbreite), für die weiblichen von 480 mg (Schwankungsbreite 214 - 658 mg) (Werte aus den Tabellen 6 und 7). Damit stimmen unsere Ergebnisse gut mit den in der Literatur gefundenen Werten überein. Eine Zusammenstellung der Resultate anderer Autoren und unserer eigenen gibt Tabelle 17. Die Versuchsbedingungen in der Literatur sind nicht streng vergleichbar, doch können die meisten Werte als repräsentativ für die Verhältnisse unter einer purinarmer Diät betrachtet werden (Löffler, 1980 (38)). Deshalb wurden sie auch mit den durchschnittlichen Poolgrößen jeweils zu Beginn der Versuchsperioden, also vor der Purinbelastung, verglichen.

Unter der Belastung mit Purinen steigt die Serumharnsäure. Der Harnsäurepool wird größer, im Mittel der beiden Perioden des Versuchs erreicht er 923 mg. Damit liegt der Mittelwert des Mindestpools unter demjenigen des mittels Isotopenverdünnungsmethode unter purinarmer Diät gefundenen von 1163 mg (Löffler et al., 1982 (40)).

Die in der Literatur gefundenen Werte für den täglichen Harnsäureumsatz sind ebenfalls in Tabelle 17 mit unseren Ergebnissen verglichen. Löffler (1980 (38)) gibt an, daß unter Berücksichtigung der zu groß bestimmten Umsatzrate bei der Anwendung von Isotopen die mittlere täglich umgesetzte Harnsäuremenge des Pools etwa 700 mg für Männer und 500 mg für Frauen beträgt. Die mittleren Ausgangswerte aus unseren beiden Versuchsperioden von 680 mg pro Tag für die männlichen und 533 mg pro Tag für die weiblichen Versuchspersonen stimmen damit gut überein, auch wenn die Vergleichbarkeit der Zahlen eingeschränkt ist, da zu Versuchsbeginn kein steady state bestand.

Tabelle 17: Harnsäurepool und Harnsäureumsatz bei verschiedenen Autoren, eigene Ergebnisse

Autor	Bestimmungs- methode	Pool in mg HS (Schwankungsbereich)	HS-Umsatz in mg/die (Schwankungsbereich)	Geschlecht, Zahl d. VP
Zöllner, 1960 (58)	Vergleich von			
	Isotopen-	1170 (940 - 1340)		5 ♂ *)
	verdünnung und	650		1 ♀
	Berechnung aus	1000		5 ♂
	dem HS-Raum	560		1 ♀
Kelley et al., 1968 (32)	Isotopen-	978 (541 - 1290)	590 (431 - 729)	6 ♂ + 2 ♀
	verdünnung			
Scott et al., 1969 (49)	Isotopen-	1221 (992 - 1650)	693 (552 - 838)	5 ♂
	verdünnung			
Löffler et al., 1982 (40)	Isotopen-	1163 ($s_{\bar{X}} = \pm 223$)	744 ($k = 0,64$)	46 ♂
	verdünnung	616 (541 - 687)	530 ($k = 0,86$)	5 ♀
eigene Ergebnisse	Berechnung aus	890 (652 - 1105)	680 (536 - 857)	3 ♂
	dem HS-Raum	480 (214 - 658)	533 (548 - 660)	4 ♀

*) Es handelt sich bei beiden Bestimmungsarten um die gleichen Versuchspersonen
VP = Versuchspersonen HS = Harnsäure k = Umsatzrate des Harnsäurepools pro Tag

6.2.1.3. Orotidyldecarboxylase

Als Normalwerte für die Aktivität der Orotidyldecarboxylase (ODC) in Erythrozyten werden Werte um 0,13 nmol/mg Protein und Stunde angegeben (Kelley et al., 1978 (34); Zöllner et al., 1978 (61)), aber auch 0,44 nmol/mg Protein und Stunde (Kelley et al., 1970 (28)). Unsere Werte, gemessen vor der Gabe von Allopurinol bzw. Ciapilom, aber unter Formeldiät und 2 g RNS/die, lagen bei einem Mittelwert von 0,31 nmol/mg Protein und Stunde (berechnet aus beiden Perioden). Allerdings waren nicht geringe individuelle Aktivitätsunterschiede zu beobachten. Die geringste gemessene ODC-Aktivität lag bei 0,07 nmol/mg Protein und Stunde, die mit Abstand höchste bei 0,63 nmol/mg Protein und Stunde. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse zeigt Tabelle 18. Danach liegt der errechnete Mittelwert aus beiden Perioden von 0,31 nmol/mg Protein und Stunde (Schwankungsbreite 0,07 - 0,63 nmol/mg Protein und Stunde) innerhalb der Normalwerte anderer Autoren, jedoch liegen unsere Werte im Durchschnitt höher als die in der neueren Literatur angegebenen.

6.2.1.4. Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase

Kelley et al. (1967 (31)) fanden für normale Personen und Personen mit Gicht und normaler Harnsäureproduktion gleiche Aktivitäten der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase. Orale Zufuhr von Purinen führt zu keiner Änderung der Enzymaktivität. In Tabelle 19 sind un-

Tabelle 18: Aktivitäten der Orotidyldecarboxylase aus Erythrozyten bei verschiedenen Autoren, eigene Ergebnisse

Kelley und Beardmore 1970 (28)	0,44	nmol/mg Protein/h
Kelley und Smith 1978 (34)	0,10 - 0,17	nmol/mg Protein/h
Zöllner et al. 1978 (61)	0,128 (s=0,068)	nmol/mg Protein/h (n=37)
eigene Ergebnisse *	0,31 (Schwankungsbereich 0,07-0,63) (n=9)	nmol/mg Protein/h

Tabelle 19: Aktivitäten der Hypoxanthin-Guaninphosphoribosyltransferase aus Erythrozyten bei verschiedenen Autoren, eigene Ergebnisse

Kelley et al. 1967 (31)	103 (s=21)	nmol/mg Protein/h (n=32)
Zöllner et al. 1978 (61)	79,5 (s=5,9)	nmol/mg Protein/h (n=13)
eigene Ergebnisse *	77,5 (Schwankungsbereich 59,5-96,9) (n=4)	nmol/mg Protein/h

* Mittelwerte aus beiden Versuchsperioden unter Formel-
diät und 2 g RNS/die (s=Standardabweichung)

sere Ergebnisse verglichen mit denen von Kelley et al. (1967 (31)), die etwas höher liegen, und mit denen von Zöllner et al. (1978 (61)), die nahezu identisch sind.

6.2.1.5. Adenin-Phosphoribosyltransferase

Tabelle 20 zeigt den Vergleich unserer Ergebnisse mit denen von Kelley et al. (1967 (31)), die höher liegen, und mit denen von Zöllner et al. (1978 (61)), die sehr gut damit übereinstimmen. (Einschränkend ist zu bemerken, daß unsere Ergebnisse nur von einer Versuchsperson stammen.) Ein Einfluß oraler Purine auf die Enzymaktivität ist auch hier nicht bekannt. Die Höhe der Serumharnsäure spielte erwartungsgemäß ebenso wie im Falle der HGPRT keine Rolle, da die Harnsäure ein Endprodukt des Purinstoffwechsels ohne regulierenden Einfluß darstellt (Kelley et al., 1967 (31)).

Tabelle 20: Aktivitäten der Adenin-Phosphoribosyltransferase aus Erythrozyten bei verschiedenen Autoren, eigene Ergebnisse

Kelley et al. 1967 (31)	31 (s=6)	nmol/mg Protein/h (n=32)
Zöllner et al. 1978 (61)	16 (s=3)	nmol/mg Protein/h (n=13)
eigene Ergebnisse *	12,8 (Schwankungsbereich 9,3-16,6) (n=2)	nmol/mg Protein/h

* Mittelwerte aus beiden Versuchsperioden unter Formeldiät und 2 g RNS/die (s=Standardabweichung)

6.2.2. Vergleich der Ergebnisse unter Ciapilom mit denen unter Allopurinol

6.2.2.1. Vergleich der Wirkung auf die Serumharnsäure, den Harnsäurepool und den Harnsäureumsatz

Unter Allopurinol sank die durch RNS erhöhte Serumharnsäurekonzentration um 2,1 mg/100 ml (35,6 %). Unter Ciapilom sank die durch RNS erhöhte Serumharnsäurekonzentration um 1,5 mg/100 ml (23,8 %). 300 mg Allopurinol waren somit 1,5 mal stärker wirksam als 600 mg Ciapilom, bezogen auf die Senkung der Serumharnsäure während einer neuntägigen Behandlung.

Tabelle 21: Vergleich der steady states von Serumharnsäure, Harnsäure-Pool und Harnsäureumsatz unter Allopurinol und Ciapilom

	Ausgangswert Formel- diät + 2g RNS 300 mg AP			Ausgangswert Formel- diät + 2g RNS 600 mg CIA		
Serum-HS (mg/100ml)	4,0	5,9	3,8	4,6	6,3	4,8
in %	100,0	147,5	95,0	100,0	137,0	104,3
HS-Pool (mg)	603	896	573	708	948	732
in %	100,0	148,5	95,0	100,0	133,9	103,9
HS-Umsatz (mg/die)		711	400		735	591
in %		100,0	56,3		100,0	80,4

Entsprechend verminderte sich der Harnsäurepool, in dessen Berechnung (siehe 4.5.1.4.) die Serumharnsäure eingeht. Der Harnsäureumsatz verringerte sich nach neuntägiger Gabe von 300 mg Allopurinol um 311 mg/die oder 43,7 %, nach 600 mg Ciapilom um 144 mg/die oder 19,6 %. Daraus läßt sich jedoch kein prinzipieller Unterschied ableiten. Die geringe Änderung des Umsatzes unter Ciapilom ist die Folge der geringeren Wirkung auf die Serumharnsäure, falls die übrigen Parameter (enterale Ausscheidung) gleichermaßen beeinflußt werden. (Zusammenstellung über die unterschiedliche Wirkung auf Serumharnsäure, Harnsäurepool und Harnsäureumsatz siehe Tabelle 21)

6.2.2.2. Vergleich der Wirkung von Allopurinol und Ciapilom auf die Aktivitäten der ODC, HGPRT und APRT

Unter der Gabe von täglich 300 mg Allopurinol trat nach etwa einer Woche ein Anstieg der Aktivität der ODC um 25 nmol/mg Protein/h auf, was einer Steigerung um 50 % der ursprünglichen Aktivität von 50 auf 75 nmol/mg Protein/h entspricht. Eine weitere zu erwartende Steigerung der Aktivität konnte wegen der Beobachtungszeit von nur neun Tagen unter Allopurinol in unserem Versuch nicht gemessen werden.

Auch unter der kontinuierlichen Gabe von täglich 600 mg Ciapilom war tendenziell ein Anstieg der Aktivität der ODC zu erkennen. Die Aktivitätszunahme betrug unter der neuntägigen Behandlung mit Ciapilom 10 nmol/mg Protein/h bzw. 38,5 % der ursprünglichen Aktivität von 26 nmol/mg Protein/h. Die Zunahme ist jedoch geringer als der Wert

der Standardabweichung und der Bereich des Mittleren Fehlers überschneidet sich (siehe Tabelle 11 und Abbildung 17). Deshalb kann keine sichere Aussage gemacht werden, auch wenn bei allen Einzelmessungen eine steigende Tendenz der Aktivität der ODC unter Ciapilomgabe zu beobachten war. Ob unter einer längeren Medikation ein weiterer Anstieg zu verzeichnen wäre, war mit der gegebenen Versuchsanordnung nicht nachprüfbar.

Obwohl durch die Hemmung der Xanthinoxidase die Konzentration der Stoffwechselprodukte vor dem Enzymblock im Serum ansteigt und somit diese Substrate für die Reutilisation im Purinstoffwechsel vermehrt zur Verfügung stehen, ist unter der Gabe von Allopurinol keine Änderung der Aktivität der HGPRT zu beobachten. Dies wurde durch unsere Versuche bestätigt. Auch unter der Gabe von 600 mg Ciapilom änderte sich die Aktivität der HGPRT unter einer neuntägigen Behandlung nicht.

Ebenso änderte sich die Aktivität der APRT unter der Behandlung mit 300 mg Allopurinol und unter 600 mg Ciapilom während der neuntägigen Beobachtungszeit nicht.

6.2.2.3. Ergebnisvergleich unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Molekulargewichte

Bisher wurden die Wirkungen von 300 mg Allopurinol mit denen von 600 mg Ciapilom verglichen. Bei Vergleich auf molarer Basis entsprechen 600 mg Ciapilom der 1,53 fachen Dosis von 300 mg Allopurinol (Allopurinol: MG = 136,1; Ciapilom: MG = 178,15). Demnach war die Wirkung von Allopurinol bezogen auf die Senkung der Serumharnsäurekonzentration 2,25 mal stärker als die von Ciapilom.

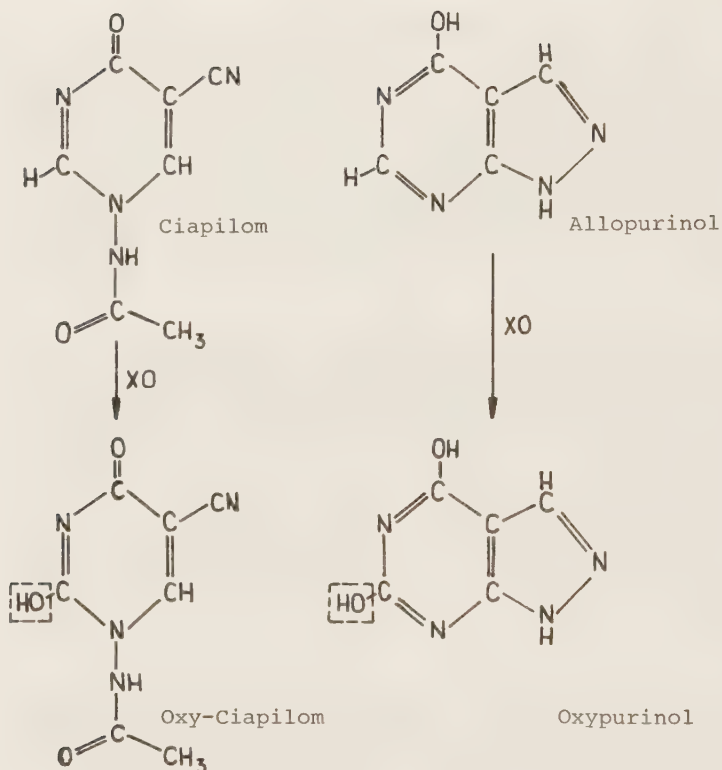
6.3. Überlegungen zur Wirkungsweise von Ciapilom

Ciapilom senkt die Serumharnsäure. Nach den Untersuchungen von Wasmer (1981 (53)) nimmt unter Ciapilom auch die renale Harnsäureausscheidung ab, während die Ausscheidung der Oxypurine im Urin ansteigt. Dies spricht dafür, daß Ciapilom als ein Hemmstoff der Xanthinoxidase wirkt.

Ebenso weisen die Berechnungen von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz auf diesen Wirkungsmechanismus hin: unter einer Therapie mit Xanthinoxidasehemmern sinken Serum- und Urinharnsäure parallel ab, der Harnsäurepool ist kleiner, der Harnsäureumsatz vermindert. Da der Harnsäureumsatz im steady state der Syntheserate entspricht, ist also auch die Harnsäuresynthese, wie aufgrund der Hemmung der Xanthinoxidase zu erwarten, vermindert.

Der täglich umgesetzte Teil des Harnsäurepools k ist unter einer Therapie mit Xanthinoxidasehemmern gegenüber der Situation vor Therapiebeginn fast unverändert, hingegen steigt bei Anwendung von Urikosurika die Umsatzrate k an. Berechnet man aus Harnsäureumsatz und Harnsäurepool den täglich umgesetzten Teil des Harnsäurepools, die Umsatzrate k (Tabelle 9 Seite 56) vor und nach der Medikation mit Ciapilom bzw. Allopurinol, so ergibt sich eine nur geringfügige Änderung von k vor und nach der Therapie. Dies spricht dafür, daß Serum- und Urinharnsäure proportional absinken und keine Änderung des Verhältnisses von renaler zu enteraler Ausscheidung erfolgt.

Auch die Tatsache, daß die chemische Struktur der beiden verglichenen Substanzen Ciapilom und Allopurinol sehr ähnlich ist, spricht für einen gleichen Wirkungsmecha-



Abbildungung 22: Mögliche Reaktionen der Xanthinoxidase mit Allopurinol und Ciapilom

nismus. Allopurinol ist ein kompetitiver Hemmstoff der Xanthinoxidase (Rundles, 1966 (46); Watts et al., 1965 (54); Wyngaarden et al., 1965 (56); Zöllner, 1967 (60)). Es ist denkbar, daß auch Ciapilom ein Substrat für die Xanthinoxidase darstellt (vergleiche Abbildung 22).

Diese Vermutung wurde durch Untersuchungen der Herstellerfirma bestätigt (Persönliche Mitteilung, Juli 1981). Danach hemmen Ciapilom und einige seiner Metaboliten die Xanthinoxidase. Ein Teil des Ciapilom wird über eine Ringöffnung an Position 2 und 6 in vitro und in vivo zu Allopurinol umgewandelt. Daß in vivo nennenswerte Mengen Allopurinol entstehen, ist nach unseren Untersuchungen möglich, denn neben der Senkung der Harnsäurekonzentration durch Ciapilom war auch der für Allopurinol typische Anstieg der Aktivität der Orotidyldecarboxylase zu beobachten, allerdings wie bei der Senkung der Serumharnsäure geringer als unter Allopurinol, wobei sämtliche Werte noch unterhalb des Bereichs der Standardabweichung der Kontrollwerte lagen.

Die Angaben der Herstellerfirma bestätigten somit unsere Ergebnisse, nach denen Ciapilom die Xanthinoxidase hemmt. Seine Wirkung und die seiner Metaboliten ist jedoch trotz der teilweisen Umwandlung in Allopurinol weit geringer als die von Allopurinol selbst. Die teilweise Umwandlung von Ciapilom in Allopurinol in vivo läßt die Anwendung in Fällen von Allopurinolallergie nicht ratsam erscheinen. Demnach kommt Ciapilom gegenüber Allopurinol eine untergeordnete Bedeutung zu.

7. Zusammenfassung

Ciapilom, ein zur Behandlung der Hyperurikämie und Gicht neu entwickelter Wirkstoff, sollte hinsichtlich seiner Wirksamkeit und seiner Wirkungsweise mit den bekannten Wirkungen von Allopurinol verglichen werden. Es wurde der Einfluß beider Medikamente auf die Serumharnsäure, den Harnsäurepool und Harnsäureumsatz sowie auf die Aktivitäten der ODC, HGPRT und APRT aus Erythrozyten untersucht.

Die Untersuchungen wurden in zwei Versuchsperioden von je 17 Tagen Dauer an sieben gesunden Versuchspersonen durchgeführt. Während der gesamten Versuchsdauer erhielten die Versuchspersonen ausschließlich eine isokalorische purinfreie Formeldiät und täglich 2 g RNS. Vom 9. bis 17. Tag nahmen die Versuchspersonen in der ersten Versuchsperiode täglich 1 x 300 mg Allopurinol und in der zweiten Versuchsperiode täglich 1 x 600 mg Ciapilom ein. Ein Teil der Versuchspersonen bekam während der ersten Periode Ciapilom und während der zweiten Allopurinol.

Folgende Parameter wurden aus den Proben bestimmt: Harnsäurekonzentration im Serum, Aktivität der ODC aus Erythrozyten, Aktivität der HGPRT aus Erythrozyten, Aktivität der APRT aus Erythrozyten. Ferner wurde aus den Werten der Harnsäure im Serum und der Harnsäureausscheidung im Urin die Größe von Harnsäurepool und Harnsäureumsatz näherungsweise berechnet.

Erwartungsgemäß führte die Einnahme von täglich 2 g RNS während der Formeldiät zu einer Steigerung der Serumharnsäurekonzentration. Ein steady state wurde erreicht, welches gut mit den Ergebnissen anderer Autoren korre-

liert. Die näherungsweise Berechnung des Harnsäurepools ergab unter 2 g RNS/die eine Vergrößerung des Pools bis zu einem steady state. Im steady state wurde der Harnsäureumsatz näherungsweise berechnet.

Es bestätigte sich, daß Allopurinol die Serumharnsäure senkt. Ebenso nimmt unter Allopurinol die Größe des Harnsäurepools sowie der Harnsäureumsatz ab. Die Aktivität der ODC stieg unter der Behandlung mit Allopurinol an. Die Aktivitäten der HGPRT und der APRT änderten sich unter der Behandlung mit Allopurinol nicht. Unsere Ergebnisse wurden mit denen anderer Autoren verglichen.

Ciapilom senkt ebenso wie Allopurinol die Konzentration der Harnsäure im Serum, jedoch deutlich geringer. Ebenso nimmt unter der Behandlung mit Ciapilom die Größe des Harnsäurepools und der tägliche Harnsäureumsatz ab, jedoch ebenfalls deutlich geringer als unter Allopurinol. Die Aktivität der ODC lag unter Ciapilom am Schluß der Behandlung auf einem etwas höheren Niveau als bei Beginn, der Anstieg war jedoch nicht signifikant. Ein Einfluß auf die Aktivitäten der HGPRT und APRT war unter der Behandlung mit Ciapilom ebenfalls nicht festzustellen.

Die Ergebnisse sind mit der Annahme vereinbar, daß Ciapilom ein Xanthinoxidasehemmer ist, der aber schwächer wirkt als Allopurinol. Neben einer Hemmung der Xanthinoxidase durch Ciapilom selbst und durch seine Metabolite ist ein möglicher teilweiser Umbau in Allopurinol als Ursache der Xanthinoxidasehemmung anzusehen.

8. Anhang

8.1. Berechnung der Formel für die ODC-Aktivität

Umrechnung der im Szintillationszähler gemessenen Counts (cpm) in (dpm) bei einer Zählröhre von 75 %:

$$1 \text{ dpm} = \text{cpm} \times \frac{100}{75}$$

$$1 \text{ Ci} \hat{=} 3,7 \times 10^{10} \text{ dps} \qquad 1 \text{ } \mu\text{Ci} \hat{=} 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$$

Die spezifische Aktivität von OMP- ^{14}C ist $34,9 \text{ mCi/mmol} = 34,9 \text{ } \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$.

Zur Umrechnung der Inkubationszeit von 15 Minuten in 1 Stunde muß mit dem Faktor 4 multipliziert werden.

$$\text{Aktivität der ODC} = \text{cpm} \times \frac{100 \times 4}{75 \times 2,22 \times 10^6 \times 34,9} \left[\frac{\mu\text{Ci} \times \text{dpm} \times \mu\text{mol}}{\text{dpm} \times \mu\text{Ci} \times \text{Std.}} \right]$$

Die Aktivität wird auf mg Protein bezogen:

$$\text{Aktivität der ODC} = \text{cpm} \times \frac{400 \times 10^{-6}}{5811 \times \text{Protein (in mg)}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{Std.}} \right]$$

$$\text{Aktivität der ODC} = \frac{\text{cpm} \times 0,4}{5811 \times \text{Protein (in mg)}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{Std.}} \right]$$

$$\text{Aktivität der ODC} = \frac{\text{cpm} \times 0,4}{5,811 \times \text{Protein (in } \mu\text{g)}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{Std.}} \right]$$

8.2. Berechnung der Formel für die HGPRT- und APRT-Aktivität

Als Multiplikationsfaktoren müssen eingesetzt werden zur Korrektur

- der Inkubationszeit von 20 Minuten auf 60 Minuten: $\times 3$
- der Teilauftragung: 20 μl des Inkubationsgemisches von 120 μl (50 μl Hämolysat, 50 μl Substratlösung, 20 μl EDTA): $\times 6$
- der Verdünnung des Hypoxanthin- ^{14}C bzw. des Adenin- ^{14}C auf 1 : 10: $\times 10$

Das ergibt einen Gesamtfaktor von 180.

$$1 \mu\text{Ci} \hat{=} 2,22 \times 10^6 \text{ dpm}$$

Die Zählrohrbeute wird mit dem Faktor $\frac{100}{60}$ berücksichtigt.

Daraus ergibt sich folgende Formel zur Berechnung der Aktivität:

$$\begin{aligned} \text{Aktivität des Enzyms} &= \\ &= \frac{\text{cpm} \times 100 \times 180}{\text{spez. Aktivität des Substrats (in } \mu\text{Ci}/\mu\text{mol}) \times 60 \times 2,22 \times 10^6 \times \text{Protein im Ink.ansatz (in mg)}} \left[\frac{\mu\text{Ci} \times \mu\text{mol}}{\mu\text{Ci} \times \text{mg} \times \text{Std.}} \right] \end{aligned}$$

$$\text{Aktivität des Enzyms} = \frac{\text{cpm} \times 0,135 \times 10^{-3}}{\text{spez. Akt.} \times \text{Protein}} \left[\frac{\mu\text{mol}}{\text{mg} \times \text{Std.}} \right]$$

$$\text{Aktivität des Enzyms} = \frac{\text{cpm} \times 0,135}{\text{spez. Akt.} \times \text{Protein}} \left[\frac{\text{nmol}}{\text{mg} \times \text{Std.}} \right]$$

9. Literaturverzeichnis

- 1 Appel, S.H. Purification and kinetic properties of brain orotidine-5'-phosphate decarboxylase
J. Biol. Chem. 243, 3924 (1968)
- 2 Beardmore, T.D. Mechanism of allopurinol-mediated increase in enzyme activity in man
Cashman, J.S.
Kelley, W.N. J. Clin. Invest. 51, 1823 (1972)
- 3 Beardmore, T.D. Effect of allopurinol on pyrimidine metabolism in the Lesch-Nyhan-Syndrome
Fox, I.H.
Kelley, W.N. Lancet II, 830 (1970)
- 4 Beardmore, T.D. Mechanism of allopurinol-mediated inhibition in pyrimidine biosynthesis
Kelley, W.N. J. Lab. Clin. Med. 78, 696 (1971)
- 5 Benedict, J.D. The metabolism of uric acid in the normal and in the gouty human studied with the aid of isotopic uric acid
Forsham, P.H.
Stetten, D. J. Biol. Chem. 181, 183 (1949)
- 6 Caskey, C.T. Enzymology of feedback-inhibition of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase by purinribonucleotides
Ashton, D.M.
Wynngaarden, J.B. J. Biol. Chem. 239, 2570 (1964)
- 7 Chalmers, R.A. A comparative study of the xanthine oxidase inhibitors allopurinol and oxipurinol in man
Krömer, H.
Scott, J.T.
Watts, R.W.E. Clin. Sci. 35, 353 (1968)
- 8 Delbarre, F. Traitement de la goutte par l'acide uracil-6-carboxylique et ses dérivés
Auscher, C. La Nouvelle Presse Médicale 37, 1765 (1963)
- 9 Du Bois, D. Nomogramm zur Bestimmung der Körperoberfläche
Du Bois, E.F. Arch. intern. Med. 17, 863 (1916)

- 10 Elion, G.B. Experimental, clinical and metabolic
Callahan, S.W. studies of the thiopurines
Hitchings, G.H. Cancer Chemotherapy Reports 16, 197
Rundles, R.W. (1962)
Laszlo, J.

- 11 Elion, G.B. Metabolic studies of allopurinol,
Kovensky, A. an inhibitor of xanthine oxidase
Hitchings, G.H. Biochem. Pharmacol. 15, 863 (1966)

- 12 Fox, I.H. Depletion of erythrozytphosphoribo-
Wyngaarden, J.B. sylpyrophosphate in man
Kelley, W.N. New Engl. J. Med. 283, 1177 (1970)

- 13 Fox, R.M. Orotaciduria induced by allopurinol
Royse-Smith, D. Science 168, 861 (1970)
O'Sullivan, W.J.

- 14 Fox, R.M. Studies of the coordinate activity and
Wood, M.H. lability of orotidylate phosphoribosyl-
O'Sullivan, W.J. transferase and decarboxylase in human
erythrocytes and the effects of allo-
purinol administration
J. Clin. Invest. 50, 1050 (1971)

- 15 Gamp, A. Behandlung der chronischen Gicht durch
Knick, B. Hemmung der Harnsäurebildung mit
Schilling, F. Allopurinol
Med. Klinik 61, 1791 (1966)

- 16 Goodman, L.S. The pharmacological basis of
Gilman, A. therapeutics. 5th Edition. New York.
The Macmillan Company (1980)

- 17 Griebisch, A. Normalwerte der Plasmaharnsäure in
Zöllner, N. Süddeutschland
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 11,
346 (1973)

- 18 Griebisch, A. Wirkung von Thiopurinol auf die renale
Zöllner, N. Harnsäure- und Oxypurinausscheidung
des Menschen
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 81,
1462 (1975)

- 19 Gröbner, W. Effect of allopurinol and its meta-
Kelley, W.N. bolic derivatives on the configuration
 of human orotate phosphoribosyltrans-
 ferase and orotidin-5'-phosphate
 decarboxylase
 Biochem. Pharmacol. 24, 379 (1975)
- 20 Gröbner, W. Harnsäurebildung im Körper
 In: Zöllner, N. (Hrsg.), Hyperuri-
 kämie und Gicht, Band 1
 Springer Verlag, Berlin (1980)
- 21 Gröbner, W. Zur Beeinflussung der Purin- und
Zöllner, N. Pyrimidinsynthese durch Allopurinol
 Klin. Wschr. 53, 255 (1975)
- 22 Gröbner, W. Störungen des menschlichen Pyrimidin-
Zöllner, N. stoffwechsels
 Münch. Med. Wschr. 117, 1453 (1975)
- 23 Gröbner, W. The influence of dietary purines and
Zöllner, N. pyrimidines on purine and pyrimidine
 biosynthesis in man
 Nutr. Metab. 21, 26 (1977)
- 24 Gröbner, W. Harnsäuresteine und Ernährung
Zöllner, N. Akt. Ernährung 3, 82 (1977)
- 25 Gröbner, W. Eigenschaften der Hypoxanthinguani-
Zöllner, N. n-phosphoribosyltransferase bei einem
 Gichtpatienten mit verminderter Akti-
 vität dieses Enzyms
 Klin. Wschr. 57, 63 (1979)
- 26 Gutman, A.E. Uric acid metabolism in normal man
Yü, T.F. and in primary gout
 New Engl. J. Med. 273, 252 (1965)
- 27 Holmes, E.W. Human glutamine phosphoribosylpyro-
McDonald, J.A. phosphate amidotransferase: kinetic
McCord, J.M. and regulatory properties
Wyngaarden, J.B. J. Biol. Chem. 248, 144 (1973)
Kelley, W.N.

- 28 Kelley, W.N. Allopurinol: alteration in pyrimidine metabolism in man
Beardmore, T.D. Science 169, 388 (1970)
- 29 Kelley, W.N. Effects of orotic acid on purine and lipoprotein metabolism in man
Greene, M.L. Metabolism 19, 1025 (1970)
Fox, I.H.
Rosenbloom, F.M.
Levy, R.I.
Seegmiller, J.E.
- 30 Kelley, W.N. Current concepts in the pathogenesis of hyperuricemia
Gröbner, W. Metabolism 22, 939 (1973)
Holmes, E.
- 31 Kelley, W.N. A specific enzyme defect in gout associated with overproduction of uric acid
Rosenbloom, F.M. Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1735 (1967)
Henderson, F.J.
Seegmiller, J.E.
- 32 Kelley, W.N. An enzymatic basis for variation in response to allopurinol. Hypoxanthine-guanine-phosphoribosyltransferase-deficiency in gout
Rosenbloom, F.M. New Engl. J. Med. 278, 287 (1968)
Miller, J.
Seegmiller, J.E.
- 33 Kelley, W.N. Excessive production of uric acid in type I glycogen storage disease
Rosenbloom, F.M. J. Pediat. 72, 488 (1968)
Seegmiller, J.E.
- 34 Kelley, W.N. Hereditary orotic aciduria in: The metabolic basis of inherited disease. 4th Edition. Edited by Stanbury, Wyngaarden, Fredrickson.
Smith, L.H.jr. Chapter 46, 1045 (1978)
- 35 Kelley, W.N. Effects of allopurinol and oxipurinol on purine synthesis in cultured human cells
Wyngaarden, J.B. J. Clin. Invest. 49, 602 (1970)

- 36 Kelley, W.N. Effects of dietary purine restriction,
Wyngaarden, J.B. allopurinol and oxipurinol on the uri-
 nary excretion of ultraviolet-
 absorbing compounds
 Clin. Chem. 16, 707 (1970)

- 37 Krenitsky, T.A. Ribonucleosides of allopurinol and
Elion, G.B. oxo-allopurinol
Strelitz, R.A. J. Biol. Chem. 242, 2675 (1967)
Hitchings, G.H.

- 38 Löffler, W. Harnsäurepool und Harnsäureumsatz
 In: Zöllner, N. (Hrsg.), Hyper-
 urikämie und Gicht, Band 1
 Springer Verlag, Berlin (1980)

- 39 Löffler, W. Harnsäurekonzentrationen in Serum
 und Geweben
 In: Zöllner, N. (Hrsg.), Hyper-
 urikämie und Gicht, Band 1
 Springer Verlag, Berlin (1980)

- 40 Löffler, W. Influence of dietary purines on pool
Gröbner, W. size, turnover rate and excretion of
Medina, R. uric acid during balance conditions.
Zöllner, N. Isotopic studies using ¹⁵N-uric-acid
 Im Druck (1982)

- 41 Lowry, O.H. Protein measurement with the Folin-
Rosebrough, N.J. phenol reagent
Farr, A.L. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
Randall, R.J.

- 42 McCollister, R.J. Pseudofeedback inhibition of purine
Gilbert, W.R. synthesis by 6-mercaptopurine ribo-
Ashton, D.M. nucleotide and other purine analogues
Wyngaarden, J.B. J. Biol. Chem. 239, 1560 (1964)

- 43 Parker, H.V. Bodywater compartements throughout
Olesen, K.H. the lifespan
McMurrey, J. In: Ciba Foundation Colloquia on Ageing.
Friis-Hansen, B. Water and electrolyte metabolism in re-
 lation to age and sex. Boston (1958)

- 44 Praetorius, E. Enzymatic determination of uric acid
Poulsen, H. with detailed directions
Scand. J. Lab. Invest. 5, 273 (1953)
- 45 Rajalakshmi, S. Control of purine biosynthesis de novo
Handschumacher, by orotic acid in vivo and in vitro
R.E. Biochim. Biophys. Acta 155, 317 (1968)
- 46 Rundles, R.W. Metabolic effects of allopurinol
and allo-xanthine
Ann. Rheum. Dis. 25, 615 (1966)
- 47 Rundles, R.W. Allopurinol in the treatment of
Metz, E.N. gout
Silberman, H.R. Ann. Int. Med. 64, 229 (1966)
- 48 Rundles, R.W. Effects of a xanthine oxidase inhi-
Wynngaarden, J.B. bitor on the thiopurine metabolism,
Hitchings, G.H. hyperuricemia and gout
Elion, G.B. Trans. Ass. Amer. Physicians 76,
Silberman, H.R. 126 (1963)
- 49 Scott, J.T. Studies of uric acid pool size and
Holloway, V.P. turnover rate
Glass, H.J. Ann. Rheum. Dis. 28, 366 (1969)
Arnot, R.N.
- 50 Smith, L.H. Pyrimidine metabolism in man
New Engl. J. Med. 288, 764 (1973)
- 51 Spector, T. Stoichiometric inhibition of reduced
Johns, D.G. xanthine oxidase by hydroxypyrazolo-
(3,4-d)-pyrimidines
J. Biol. Chem. 245, 5079 (1970)
- 52 Waslien, C.I. Uric acid production of men fed
Calloway, D.H. graded amounts of egg protein and
Margen, S. yeast nucleic acid
Am. J. Clin. Nutr. 21, 892 (1968)

- 53 Wasmer, C. Vergleichende Untersuchungen über den Einfluß von Ciapilom sowie Allopurinol auf die renale Harnsäure-, Oxypurin- und Orotsäureausscheidung unter standardisierten Ernährungsbedingungen Inaugural-Dissertation, München (1981)
- 54 Watts, R.W.E. Xanthine oxidase activity in human
Watts, J.E.M. tissues and its inhibition by
Seegmiller, J.E. allopurinol
J. Lab. Clin. Med. 66, 188 (1965)
- 55 Wyngaarden, J.B. Gout
Kelley, W.N. In: The Metabolic basis of inherited disease. 4th Edition. Edited by Stanbury, Wyngaarden, Fredrickson. Chapter 43, 916 (1978)
- 56 Wyngaarden, J.B. Allopurinol in the treatment of
Rundles, R.W. gout
Metz, E.N. Ann. Int. Med. 62, 842 (1965)
- 57 Zöllner, N Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten 2. Aufl., Stuttgart (1957)
- 58 Zöllner, N. Moderne Gichtprobleme. Ätiologie, Pathogenese, Klinik
Ergebn. Inn. Med. 14, 321 (1960)
- 59 Zöllner, N. Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung
Z. Klin. Chemie 6, 178 (1963)
- 60 Zöllner, N. Die Behandlung der Gicht und der Uratnephrolithiasis mit Allopurinol
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 72, 782 (1967)
- 61 Zöllner, N. Juvenile Gicht mit verminderter Aktivität der Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase und Phäochromozytom
Goebel, F.D.
Öhlschlägel, G.
Gröbner, W. Dtsch. Med. Wschr. 103, 1044 (1978)

- 62 Zöllner, N.
Griebsch, A. Influence of various dietary purines
on uric acid production
In: Renal Stone Research, Karger
Verlag, Basel, Seite 84 (1973)
- 64 Zöllner, N.
Gröbner, W. Der unterschiedliche Einfluß von
Allopurinol auf die endogene und
exogene Uratquote
Europ. J. Clin. Pharmacol. 3, 56
(1970)
- 65 Zöllner, N.
Gröbner, W. Influence of oral ribonucleic acid
on orotaciduria due to allopurinol
administration
Z. Ges. Exp. Med. 156, 317 (1971)
- 66 Zöllner, N.
Janssen, A.
Gröbner, W. Partielle Aufhebung der Allopurinol-
induzierten Orotazidurie durch
Ribonukleotide
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 81,
1466 (1975)
- 67 Zöllner, N.
Schatten- Allopurinol in der Behandlung der
kirchner, M. Gicht und der Harnsäure-Nephro-
lithiasis
Dtsch. Med. Wschr. 92, 654 (1967)

Mein besonderer Dank gilt Herrn
Professor Dr. N. Zöllner, der
mir die Möglichkeit gab, meine
Arbeit an seiner Klinik durch-
zuführen.

Mein Dank gilt vor allem auch
Herrn Professor Dr. W. Gröbner,
der mir freundlicherweise das
Thema der Arbeit überließ und
mir mit seinem Rat stets zur
Seite stand.

Lebenslauf

Gabriel Wasmer,
geboren am: 15. Mai 1952 in Stuttgart
Familienstand: verheiratet
Eltern: Prof. Dr. Otmar Wasmer und
Else Wasmer, geb. Frey,
aus Grünwald
Schulen: 1959 - 1963 Volksschule in
Stuttgart-Hohenheim und Karlsruhe
1963 - 1972 Humanistisches Gymnasium
in Karlsruhe und München
Studium: 1973 - 1974 Studium der Chemie und
Physik an der Universität München
1976 - 1981 Studium der Humanmedizin
an der Universität München
Wehrdienst: 1974 - 1975 im Sanitätsdienst
Approbation: 10. November 1981 Approbation als
Arzt
Dissertation: Mit der vorliegenden Dissertation
war ich von 1978 bis 1981 beschäftigt.

